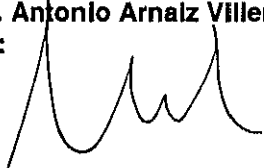


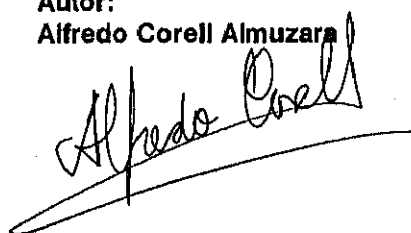
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZACION DE UN NUEVO
LOCUS DEL SISTEMA PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO:
HLA-DRB6.**

Director
Prof. Antonio Arnalz Villena
VºBº:



Autor:
Alfredo Corell Almuzara



TESIS DOCTORAL
por
ALFREDO CORELL ALMUZARA
Madrid, 1992

TESIS DOCTORAL



* 5 3 0 9 5 7 0 5 3 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**Caracterización de un nuevo locus
del Sistema Principal de
Histocompatibilidad humano: HLA-DRB6.**

Director: *Prof. Antonio Arnaiz Villena*

Autor: *Alfredo Corell Almuzara*

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

AÑO 1992

LUGAR DE REALIZACION:

Laboratorio de Inmunología
del Hospital "12 de Octubre",
Madrid

DEDICATORIA:

*A mis padres y hermanos, por su
confianza, apoyo y cariño.*

AGRADECIMIENTOS

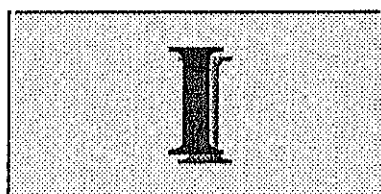
Al Prof. Antonio Arnaiz Villena, director del estudio, por la ayuda en la planificación y confección del Proyecto de tesis doctoral que se presenta y por el apoyo en el trabajo de laboratorio día a día.

A todos los componentes, presentes y pasados, del laboratorio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre, por el apoyo y colaboración prestados durante la realización del presente trabajo, y de los que tanto he aprendido en los últimos cinco años, especialmente a: Manolo, Jose Ramón, Jorge, Jose Luis, Lola, Mercedes, Paloma y Oscar.

Muy especialmente, a todos aquellos que me han soportado de manera directa y sobre los que a veces habré descargado mis tensiones: Pilar, Pablo, Estela, Julia, Ana, Pilar, Isabel, Paz, Marcos, M^a Angeles, Agueda, Rafa, Jesús y Fernando.

Finalmente, no puedo sino estar agradecido a muchos amigos, tanto del laboratorio como de otros lugares. Gracias por estar conmigo incondicionalmente y gracias por ser "mi gente".

Realmente, esto de llegar a ser doctor es como "un sueño". Un sueño, que nunca ha sido solamente mío. Un sueño que he compartido con mi familia: mis padres, mis hermanos, mi abuela, mi abuelo Eduardo, mis tíos, mis amigos, mis compañeros. Pero es un sueño que no se sueña, sino que hay que construirlo trabajando duro todos los días, y renunciando a tantas cosas..., pero merece la pena.



Indice

RESUMEN.....	1
---------------------	----------

INTRODUCCION

1. El Sistema Principal de Histocompatibilidad.....	2
1.1 ¿Qué es un Sistema Principal de Histocompatibilidad?.....	2
1.2 El Sistema Principal de Histocompatibilidad Humano: sistema HLA.....	2
1.3 Mapa genético del sistema HLA.....	3
2. Proteínas y genes del sistema HLA.....	5
2.1 Antígenos de clase I.....	5
2.1.1 Estructura de los antígenos de clase I.....	5
2.1.2 Región de genes de clase I.....	8
2.1.2.1 Los loci para antígenos de clase I clásicos (HLA-A,-B,-C).....	8
2.1.2.2 Los loci para antígenos de clase I no clásicos (HLA-E,-F,-G,-H).....	9
2.2 Antígenos de clase II.....	11
2.2.1 Estructura de los antígenos de clase II.....	12
2.2.2 Región de genes de clase II.....	13
2.2.2.1 Genes que codifican para antígenos de clase II.....	13
2.2.2.2 Genes que codifican para otras proteínas....	16
2.3 Proteínas y genes de clase III.....	17
2.3.1 Los genes del complemento y sus productos proteicos: C2, C4 y Bf.....	17
2.3.2 Genes para linfocinas: TNF.....	20
2.3.3 Genes para enzimas: 21-hidroxilasa.....	21

2.3.4	Genes para proteínas de shock: HSP-70.....	21
2.3.5	Genes para proteínas con elementos repetitivos: RD y OSG.....	22
2.3.6	Genes para proteínas de función desconocida: BAT y G.....	22
3.	Polimorfismo del sistema HLA.....	23
3.1	Polimorfismo serológico del sistema HLA.....	23
3.2	Polimorfismo genético de restricción (RFLPs).....	23
3.3	Polimorfismo genético de secuencia de DNA.....	26
3.4	Polimorfismo de "dosis génica":.....	26
3.4.1	El caso de los genes de C4.....	26
3.4.2	El caso de la región HLA-DR.....	28
3.5	Posibles orígenes del polimorfismo del sistema HLA.....	29

OBJETIVOS..... 31

MATERIAL, PACIENTES y METODOS

1.	Preparación de las disoluciones empleadas.....	32
2.	Determinación del fenotipo HLA.....	36
2.1	HLA-A, -B, -C, -Bw4, -Bw6.....	36
2.2	HLA-DR, -DQ	36
3.	Aislamiento del material genético:.....	38
3.1	Extracción de DNA genómico.....	38
3.2	Extracción de RNA citoplásmico total.....	38
4.	Obtención de Fragmentos de Restricción:.....	40
4.1	Preparación y purificación de plásmidos y sondas.....	40

4.2	Tratamiento del DNA genómico con endonucleasas de restricción.....	41
4.3	Electroforesis y transferencia a filtros de Nylon.....	42
4.4	Hibridación con sondas marcadas y autorradiografía.....	43
5.	Reaccion en cadena de la Polimerasa:.....	46
5.1	Oligonucleotidos empleados.....	46
5.2	Reacciones de amplificación de DNA.....	46
5.3	Reacciones de amplificación de RNA.....	46
5.4	Controles de amplificación.....	47
6.	Tecnica de tipaje con oligosondas (oligotipaje).....	49
6.1	Transferencia del DNA amplificado a filtros de nylon.....	49
6.2	Marcaje radioactivo de oligonucleotidos.....	49
6.3	Hibridación de los filtros, lavados y autorradiografía.....	49
7.	Secuenciación de DNA:.....	51
7.1	Preparación del bacteriofago M13.....	51
7.2	Clonado del material amplificado en el bacteriofago.....	51
7.3	Preparación de bacterias competentes y transfección.....	51
7.4	Selección, amplificación y purificación de los clones recombinantes.....	52
7.5	Reacciones de Secuenciación:.....	52
7.5.1	Reacciones de secuenciación con Sequenasa.....	52
7.5.2	Reacciones de secuenciación con Taq-polimerasa...	53
7.6	Carga de los productos en el gel, detección y obtención de las secuencias.....	53
8.	Análisis de secuencias:.....	57
8.1	Programas de predicción de estructura secundaria de proteínas.....	57

8.2	Programas para cálculo de homología entre secuencias y construcción de dendrogramas.....	57
9.	Individuos, Familias y Líneas Celulares.....	58
9.1	Individuos no relacionados.....	58
9.2	Familias.....	58
9.3	Células Homocigotas de Tipaje.....	58

RESULTADOS

1.	Caracterización de la secuencia de DNA del exón 2 del alelo HLA-DR13b:.....	63
1.1	Definición del alelo HLA-DR13b.....	63
1.2	Selección de individuos no emparentados con tipificación HLA-DR13b.....	63
1.3	Identificación de la secuencia de DNA del exón 2 de HLA-DR13b.....	64
2.	Análisis de secuencias del exón 2 de los diferentes genes HLA-DRB.....	67
2.1	Obtención de 29 secuencias de DNA del exón 2 de los diferentes loci HLA-DRB.....	67
2.2	Descripción de dos nuevas variantes alélicas	71
2.3	Las nuevas variantes pertenecen a la familia de genes DRB.....	71
3.	Estudio de la distribución y segregación del nuevo gen en los diferentes haplotipos HLA-DR.....	73
3.1	Distribución por haplotipos de las dos nuevas secuencias.....	73
3.2	Segregación de las secuencias de DRB6 en familias.....	75
4.	Estudios de expresión del gen HLA-DRB6.....	77
4.1	Estudios indirectos: amplificación genérica de genes DRB y oligotipaje locus-específico.....	77

4.2	Estudios directos: amplificación específica de transcritos DRB6.....	78
5.	Determinación de la estructura secundaria de la hipotética proteína DRB6.....	80
6.	La caracterización del gen DRB6 aporta datos muy importantes en los estudios evolutivos de la región HLA-DR.....	82
6.1	Situación evolutiva del gen DRB6 dentro de la familia de genes DRB.....	82
6.2	Evolución de los diferentes haplotipos HLA-DR: grupos evolutivos.....	82
7.	Variabilidad de dosis génica: situación de DRB6 en los haplotipos DR1, DR2 y DR10.....	87
8.	Obtención de secuencias más largas del exón 2 del gen HLA-DRB6.....	88
8.1	Descripción de un tercer alelo del locus DRB6.....	88
8.2	Presencia de codones de terminación en el exón 2 de los diferentes alelos de HLA-DRB6.....	91

DISCUSION

1.	El alelo HLA-DR13b se pudo haber originado por un mecanismo de conversión génica.....	92
2.	El locus HLA-DRB6:.....	93
2.1	Distribución por haplotipos.....	93
2.2	Alelos del locus DRB6.....	94
3.	HLA-DRB6: ¿Gen o pseudogen?.....	94
3.1	Estudios de expresión.....	94
3.2	Predicción de estructura proteica.....	95
3.3	Características nucleotídicas del exón 2 de HLA-DRB6.....	95
4.	Situación evolutiva de HLA-DRB6 dentro de la familia de genes HLA-DRB.....	97

4.1	HLA-DRB6 es el gen más antiguo de la familia DRB.....	97
4.2	Evolución de los diferentes haplotipos HLA-DRB.....	97

CONCLUSIONES.....	100
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA.....	103
--------------------------	------------

ANEXO I

Abreviaturas más comunes utilizadas en el texto.....	109
--	-----

II

Resumen

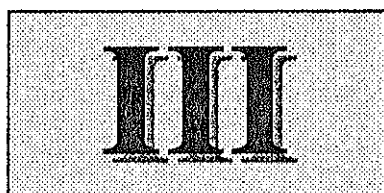
Estudios recientes de la región HLA, con técnicas de DNA, han permitido encontrar un elevado polimorfismo en la mayoría de los *loci*. Dentro de esta región, uno de los *loci* más polimórficos es el denominado HLA-DR. Las variaciones alélicas del locus HLA-DR están prácticamente confinadas al dominio proteico $\beta 1$ (región N-terminal), codificado por el exón 2 de los diferentes genes HLA-DRB. Este exón se puede amplificar mediante la técnica de PCR, cuya aplicación ha permitido identificar más de 50 secuencias nucleotídicas HLA-DRB diferentes.

El análisis de Células Homocigotas de tipaje, individuos no relacionados y familias, ha permitido la caracterización de 4 nuevas secuencias del exón 2 de HLA-DRB. Una de ellas es un subtipo del antígeno HLA-DR6, denominado HLA-DR13b. Las otras 3 secuencias suponen tres variantes alélicas de un nuevo locus de la región, que hemos denominado HLA-DRB6.

Con la descripción de este nuevo locus, el número de RFLPs de los diferentes haplotipos HLA-DR coincide con el número de loci HLA-DRB que poseen. Además, la presencia de este locus en los haplotipos HLA-DR1, -DR2 y -DR10, permite establecer tres grupos evolutivos dentro de la región DR: el grupo del **DR52** que incluye los haplotipos HLA-DR3, -DR5, -DR6 y -DR8; el grupo del **DR53** que incluye los haplotipos HLA-DR4, -DR7 y -DR9; y el grupo del **DRLIV** (portadores de DRB6) que incluye los haplotipos HLA-DR1, -DR2 y -DR10.

Estudios comparativos de las secuencias de HLA-DRB6 con otras secuencias de clase II (DRB, DQB y DPB) permiten encuadrar este nuevo locus dentro de la familia DR. Pero además, permiten construir un árbol evolutivo de los genes comparados, de lo que resulta que el nuevo gen descrito es probablemente el más antiguo de la familia DRB y, por tanto, el primero que evolucionó a partir del gen HLA-DRB ancestral.

Se han detectado transcritos, al menos parciales, del gen HLA-DRB6; sin embargo, los tres alelos caracterizados presentan codones de terminación al final de su exón 2, por lo que originarían proteínas severamente truncadas. Finalmente, se realizó una predicción de estructura secundaria para las dos nuevas secuencias caracterizadas; dicha predicción se basa en el posible estado conformacional de cada uno de los residuos de un determinado dominio proteico. Comparando la predicción de estructura con la de los otros genes conocidos, se concluye que de existir un producto proteico de este gen, debería ser bastante diferente de las proteínas HLA-DR conocidas.



Introducción

1. El Sistema Principal de Histocompatibilidad

1.1 ¿Qué es un sistema principal de histocompatibilidad?

Cuando un tejido o parte de un tejido (injerto) de un individuo se trasplanta a otro diferente, el injerto puede ser destruido por el sistema inmunológico del individuo receptor debido a que el tejido donado expresa moléculas de superficie celular diferentes a las que expresan los tejidos del individuo receptor. Estas moléculas actúan, pues, como meros antígenos, del mismo modo que moléculas de agentes extraños patógenos (virus o bacterias) estimulando a los linfocitos del receptor. Estos antígenos o moléculas de superficie celular determinan, por lo tanto, si un tejido es o no compatible inmunológicamente; actúan como antígenos de histocompatibilidad y son codificados por genes de histocompatibilidad. La mayoría de estos antígenos producen reacciones de rechazo moderadas y lentas cuando actúan de modo independiente. Hay, sin embargo, un grupo de antígenos de histocompatibilidad que producen una rápida destrucción y rechazo del tejido injertado y que son los principales responsables de la aceptación o rechazo de los injertos; debido a ello se denominan Antígenos Principales de Histocompatibilidad (Klein 1990). Además, los genes que los codifican se agrupan en una pequeña región cromosómica denominada Sistema Principal de Histocompatibilidad o MHC (del inglés: Major Histocompatibility Complex).

Se han identificado sistemas principales de histocompatibilidad en el hombre, chimpancé, gorila, orangután, ratón, rata común, rata del desierto, hamster sirio, conejo, perro, gato, vaca, cerdo, oveja, caballo, pollo, y ranas comunes. Asimismo, se tienen pruebas indirectas de su presencia en otras especies y se cree que probablemente exista en todos los animales vertebrados. Hasta ahora no se ha detectado su presencia en ningún invertebrado.

1.2 El Sistema Principal de Histocompatibilidad humano: Sistema HLA.

El sistema principal de histocompatibilidad en el hombre se denomina sistema HLA (antígenos leucocitarios humanos; del inglés: Human Leucocytes Antigens). El sistema HLA se localiza físicamente en el brazo corto del cromosoma 6 ocupando una longitud de 4 centimorgan (cM), aproximadamente 4 millones de pares de nucleótidos (Ferrando y col., 1981). Dependiendo del origen genético y/o funcionalidad biológica de sus productos, el conjunto de genes del sistema HLA puede dividirse en 2-4 grandes grupos (Klein, 1977; Klein, 1984; Klein 1990; Brostoff y col. 1991; Trowsdale y col. 1991) (Figura 1):

GENES DE CLASE I: codifican para las proteínas de membrana/antígenos de los loci HLA-A, -B y -C (antígenos de clase I). Son moléculas implicadas en la restricción del reconocimiento antigénico por linfocitos T, predominantemente por linfocitos T citotóxicos. Su distribución es general en tejidos somáticos, si bien existen grandes diferencias en cuanto a su expresión cuantitativa. Células musculares, fibroblastos y células del sistema nervioso tienen un bajo contenido de moléculas de clase I, y únicamente células pertenecientes al sistema inmune (linfocitos T, B y macrófagos) presentan altas concentraciones de estas proteínas en su superficie.

GENES DE CLASE II: codifican para las proteínas de membrana/antígenos de las subregiones HLA-DR, -DQ y -DP. Estas regiones están formadas a su vez de varios genes. Se han descrito recientemente otros genes de clase II

no agrupados en estas subregiones, HLA-DN, -DO y -DM (Trowsdale y Kelly, 1985; Tonnelie y col., 1985; Kelly y col., 1991a). Estas proteínas, al igual que las de la clase I, están involucradas en los fenómenos de restricción del reconocimiento antigénico pero en este caso principalmente por linfocitos T reguladores. Su distribución tisular está limitada a células del sistema inmune (linfocitos B, macrófagos, linfocitos T activados) o células que posiblemente también intervienen en reacciones inmunes (células epidérmicas de Langerhans y células dendríticas tímicas). Muy recientemente se han descrito un gran número de genes que, sin codificar para antígenos de clase II, se sitúan dentro de esta región y parecen intervenir en el procesamiento de los antígenos exógenos (Trowsdale y col. 1991)

GENES DE CLASE III: codifican para una gran variedad de proteínas, algunas de ellas relacionadas con funciones inmunológicas y otras no. Entre las proteínas con funciones inmunológicas podemos destacar los componentes de la cascada del complemento Bf, C2 y C4; los factores de necrosis tumoral TNF-A y TNF-B y el gen para la Hsp-70 (del inglés: Heat Shock Protein). De hecho, la ausencia de relación funcional o evolutiva entre estos genes y los antígenos HLA hace que algunos autores no los consideren propiamente dentro del Sistema Principal de Histocompatibilidad (Klein 1990).

GENES DE CLASE IV: Codifican para moléculas con una estructura similar a la de clase I pero con distribución tisular muy reducida. Se cree que pueden funcionar como antígenos de diferenciación durante la embriogénesis (Brostoff y col. 1991). Su clasificación como genes de clase

IV deriva de la de los genes Qa y Tl del MHC del ratón que se encuentran físicamente apartados de clase I. Sin embargo, en el hombre estos genes se localizan intercalados y muy próximos a los de los antígenos de clase I (HLA-A, -B, -C) y no debe considerarse la existencia de una región de clase IV (Klein 1990).

1.3 Mapa genético del sistema HLA

En los últimos 3 años se han publicado numerosos mapas genéticos del sistema HLA con una complejidad cada vez mayor (Hurd 1989; Spence y col. 1989; Klein 1990; Trowsdale y col. 1991). El creciente conocimiento de este complicado sistema genético es debido, principalmente, al rápido desarrollo que las técnicas de genética molecular han permitido en la caracterización de nuevos loci y alelos del sistema. El mapa más completo y reciente (Trowsdale y col. 1991) registra 15 loci diferentes en la región de clase I, 31 en la región de clase II y 36 en la región de clase III (Figura 1).

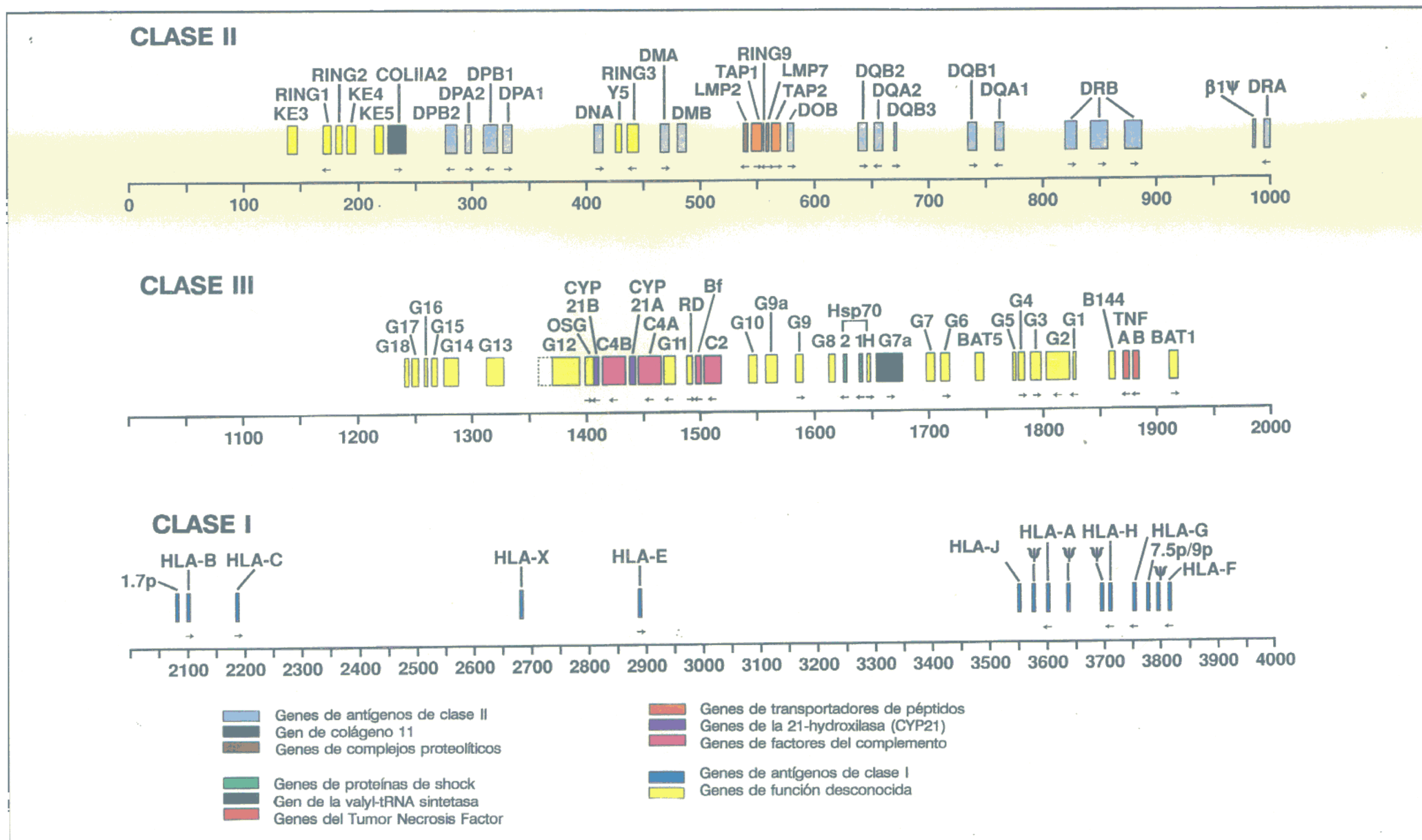


Figura 1. Mapa del Sistema Principal de Histocompatibilidad humano. Tomado de Trwsdale y col., 1991

2. Proteínas y genes del sistema HLA

2.1 Antígenos de clase I

Los antígenos HLA-A, -B, -C son detectados, fundamentalmente, en linfocitos de sangre periférica mediante anticuerpos presentes en el suero de embarazadas (Payne y Rolfs, 1958; van Rood y col., 1958) o en el de individuos inmunizados por transfusiones (Dausset, 1954). Inicialmente se emplearon ensayos de leucoaglutinación y, más tarde, técnicas de fijación de complemento a plaquetas (Shulman y col., 1962). En la actualidad, se determinan mediante ensayos de microlinfocitotoxicidad, que son más rápidos y reproducibles (Terasaki y McClelland, 1964; Mittal y col., 1968). El primer antígeno HLA definido fue de clase I y se llamó isoantígeno MAC (ahora A2 + A28) (Dausset, 1958). Por su relevancia cabe destacar también el descubrimiento de los antígenos 4a y 4b (Bw4 y Bw6 actualmente) (van Rood y van Leeuwen, 1963). Estos dos últimos antígenos están presentes de manera excluyente en los antígenos HLA-B dividiéndoles en 2 grupos, uno asociado a Bw4 y otro a Bw6. En estos momentos se sabe que Bw4 y Bw6 no son sino epítomos dentro de la propia molécula HLA-B, y que aparecen también en algunos antígenos HLA-A y HLA-C (Kostyu y col., 1980; Layet y col., 1985; Arnaiz-Villena y col., 1989).

2.1.1 Estructura de los antígenos de clase I

Los antígenos HLA de clase I clásicos (HLA-A, -B y -C) están compuestos de 2 cadenas polipeptídicas; una cadena pesada de 44 kd transmembranal y una cadena ligera de 12 kd unida no covalentemente a la primera en su porción extracelular (Figura 2). La cadena pesada es la única codificada por genes dentro del sistema HLA; la cadena ligera, β 2-microglobulina (β 2-m), se encuentra codificada en el cromosoma 15 en el hombre. La

porción extracelular de la cadena pesada se divide en 3 dominios: α 1, α 2 y α 3 de aproximadamente 90 aminoácidos cada uno, codificados por 3 exones distintos (Malissen y col., 1982). El dominio α 3 y la β 2-m presentan secuencias relativamente conservadas y de gran homología con los dominios constantes de las inmunoglobulinas (Srivastava y col., 1985). Los dominios α 1 y α 2, que presentan fundamentalmente el polimorfismo de los antígenos HLA de clase I, no presentan secuencias homólogas significativas con las regiones constantes o variables de las inmunoglobulinas.

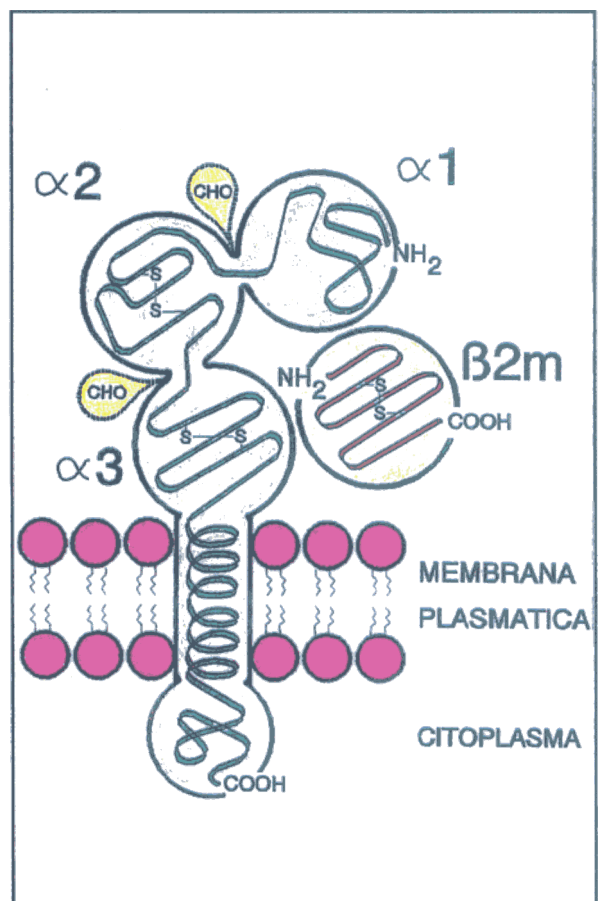


FIGURA 2. Estructura esquemática de los antígenos de clase I. Se representa en VERDE el polipéptido pesado (α) y variable, y en NARANJA el polipéptido ligero (β) invariante. Los puentes disulfuro se indican en rojo.

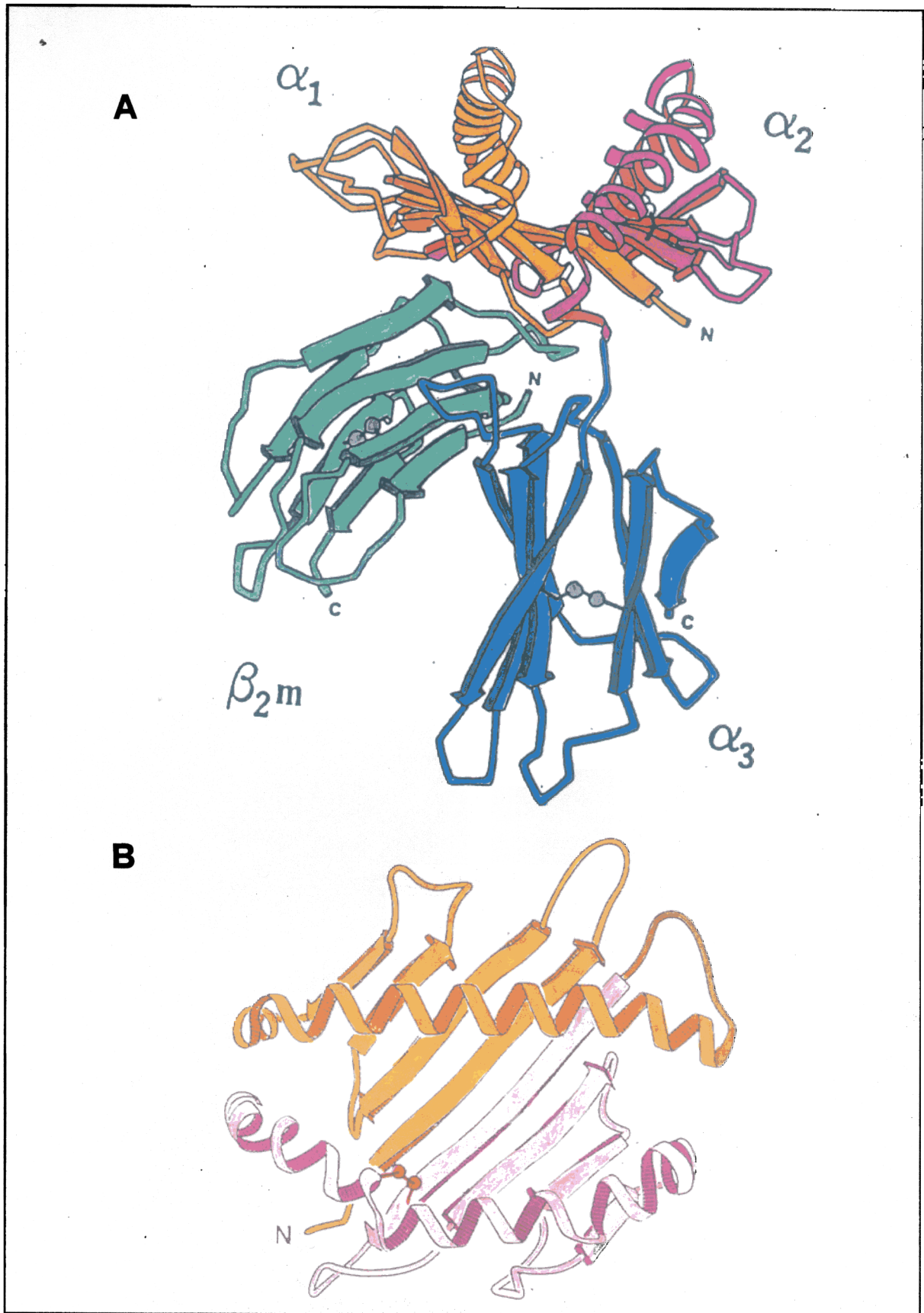


FIGURA 3. -Representación esquemática de la estructura cristalográfica del antígeno HLA-A2. A) Estructura completa tridimensional, donde se representan las láminas beta con flechas y las hélices alfa mediante lazadas enrolladas. Los puentes disulfuro se representan mediante 2 esferas conectadas. B) Representación de la parte más distal de la molécula, vista desde arriba, es decir, tal y como la vería el receptor para antígeno de los linfocitos T..

La cristalización de las moléculas es un paso previo a la determinación de estructura tridimensional mediante difracción de rayos X. El primer antígeno HLA que se ha logrado cristalizar ha sido HLA-A2, de clase I, y se ha publicado recientemente su estructura tridimensional (Bjorkman y col, 1987). Las moléculas de clase I están formadas por dos pares de dominios estructuralmente similares: $\alpha 1$ con $\alpha 2$ y $\alpha 3$ con $\beta 2$ -m. En la figura 3 puede verse un esquema de la estructura tridimensional de la parte extracitoplasmática de la molécula antes mencionada. El dominio $\alpha 3$ y la molécula $\beta 2$ -m están más próximos a la membrana celular y los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ más externos. A su vez, las estructuras α -hélice de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son las zonas más lejanas a la membrana. Un esquema de estos 2 últimos dominios vistos desde arriba (exterior celular) puede verse también en la figura 3 (B), y correspondería a la superficie que es reconocida por el receptor del linfocito T (TCR, del inglés: T Cell Receptor) (Bjorkman y col., 1987).

Los dominios $\alpha 3$ y $\beta 2$ -m son 2 estructuras β -laminar enfrentadas, una con 4 cadenas β y otra con 3, conectadas por un

puente disulfuro cada una, tal como se ha descrito en las regiones constantes de las inmunoglobulinas (figura 3). $\alpha 1$ y $\alpha 2$ consisten cada uno de una estructura β -antiparalela y una α -hélice (figura 3). En el dominio $\alpha 2$ existe un puente disulfuro que une la cadena β -NH2 terminal y su α -hélice más larga. Las 2 estructuras β de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ forman una única de 8 cadenas y, por encima, paralelas entre ellas mismas están las 2 estructuras α -hélices. En el aminoácido 86 (Asparagina) la cadena pesada presenta una ramificación de oligosacáridos que conecta los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Entre las 2 α -hélices largas de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ aparece una hendidura, cuyo fondo viene dado por las láminas β . Las dimensiones de esta hendidura o bolsillo son consistentes con un lugar de unión para un pequeño péptido de un antígeno extraño procesado (Bjorkman y col., 1987). De hecho, se ha demostrado muy recientemente (Monaco, 1992), que para que las proteínas HLA de clase I se expresen en la superficie celular, es necesario un ensamblaje intracitoplasmático con el péptido exógeno procesado y la $\beta 2$ -microglobulina. Sólomente este complejo tri-molecular madura y se exporta a la superficie (Figura 4).

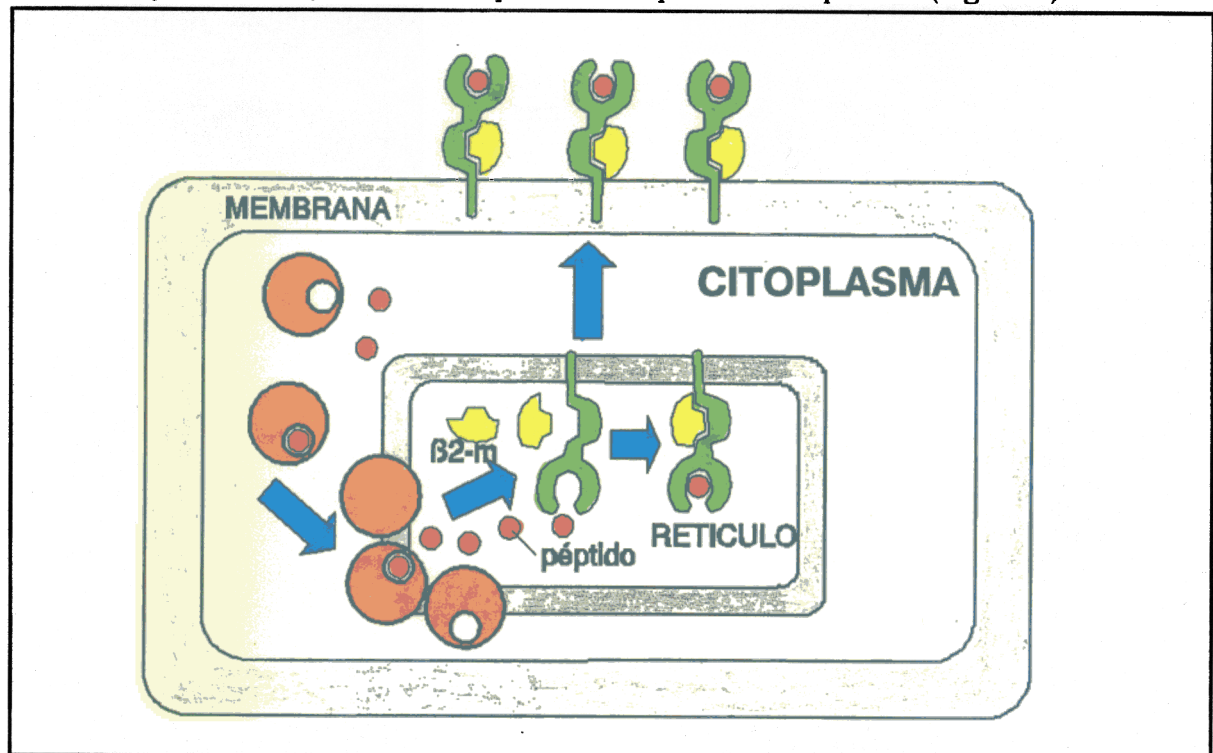


FIGURA 4. Síntesis, ensamblaje y exportación de los antígenos de clase I. Algunos componentes del complejo proteolítico están codificados por los genes LMP. Los transportadores son codificados por los genes TAP. Ambos tipos de genes, se localizan en la región de clase II del sistema HLA

2.1.2 Región de genes de clase I

La Región de genes de clase I del sistema principal de histocompatibilidad humano ocupa aproximadamente unas 2.000 kb de DNA (Lawrance y col. 1987) y contiene aproximadamente 20 loci entre genes, pseudogenes y fragmentos de genes (Srivastava y col. 1985; Koller y col., 1987; Lawlor y col. 1990). Los miembros funcionales dentro de la familia de genes de clase I se consideran de entre los más polimórficos de la naturaleza (Parham y col. 1989). Los primeros genes conocidos de esta región fueron los que codifican para los denominados antígenos de trasplante (HLA-A, -B y -C). Pero había datos experimentales que apuntaban a la existencia de otros genes muy similares: 1) por una parte el conocimiento de genes análogos a los de clase I en el MHC del ratón (regiones Qa y Tla; Flaherty 1981; Flavel y col. 1985) y b) por otra parte, los patrones de restricción generados con sondas de cDNA de genes de clase I evidenciaba la presencia de entre 17 y 20 genes diferentes en esta región (Orr y DeMars, 1983). Hasta el momento se han asignado nombres oficiales (Bodmer y col. 1992) a los loci para los genes HLA-E, -F, -G, -H, y -J, pero se conoce la existencia de al menos otros 7 loci: 1.7p, HLA-X, 7.5p/9p y 4 pseudogenes (ver figura 1).

2.1.2.1 Los loci para antígenos clase I clásicos (HLA-A, -B, -C)

Los genes que codifican para los antígenos HLA-A, -B y -C se han denominado "clásicos" por ser los primeros en conocerse dentro del sistema HLA y además por presentar una expresión muy amplia en las células del organismo. Frente a estos 3 loci, los recientes genes de clase I encontrados (HLA-E, -F, -G,...)

se han denominado "no clásicos".

En la figura 5 se representa la estructura de un gen de clase I tipo (cadena pesada, Malissen y col. 1982) siendo esta muy similar en los distintos loci. La comparación entre secuencias procedentes de RNA mensajero y las obtenidas a partir de DNA genómico ha permitido establecer la organización intrón/exón de los genes de clase I funcionales (Figura 5). Además de un exón primero que codifica para un péptido líder de 24 aminoácidos, hay otros 7 exones de los cuales los exones 2 a 5 codifican para los 3 dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y el dominio hidrofóbico de la región transmembranal. Sin embargo el dominio citoplásmico se codifica por los exones 6 a 8 en el caso de HLA-A2, A3, A24 y Cw3, o por los exones 6 y 7 en el caso de los alelos de la serie HLA-B, en los que el exón 8 codifica solamente para la región 3' no traducida (3'UT). Aunque los genes de clase I tienen una señal de poliadenilación clásica tipo "AATAAA" los elementos reguladores del promotor no están muy conservados. Mientras que en los genes equivalentes de clase I del MHC del ratón se encuentra una señal convencional "TATAAA" 30 nucleótidos (-30) por encima del codón de iniciación (TATA box), los genes humanos análogos presentan la secuencia TCTAAA para todos los alelos de clase I exceptuando el HLA-Cw3 que presenta TCTGAA. Además, la señal en la posición -50 ha resultado ser "CCAAT" en todos los genes de clase I, exceptuando de nuevo al HLA-Cw3 que presenta dicha señal en la posición -118 (Strachan, 1987). Se han encontrado otras secuencias reguladoras de la expresión como son la denominada CRE (del inglés: Class I Regulatory Element) que se sitúa entre las posiciones -200 y -160 con 3 subregiones muy claras y que sirve

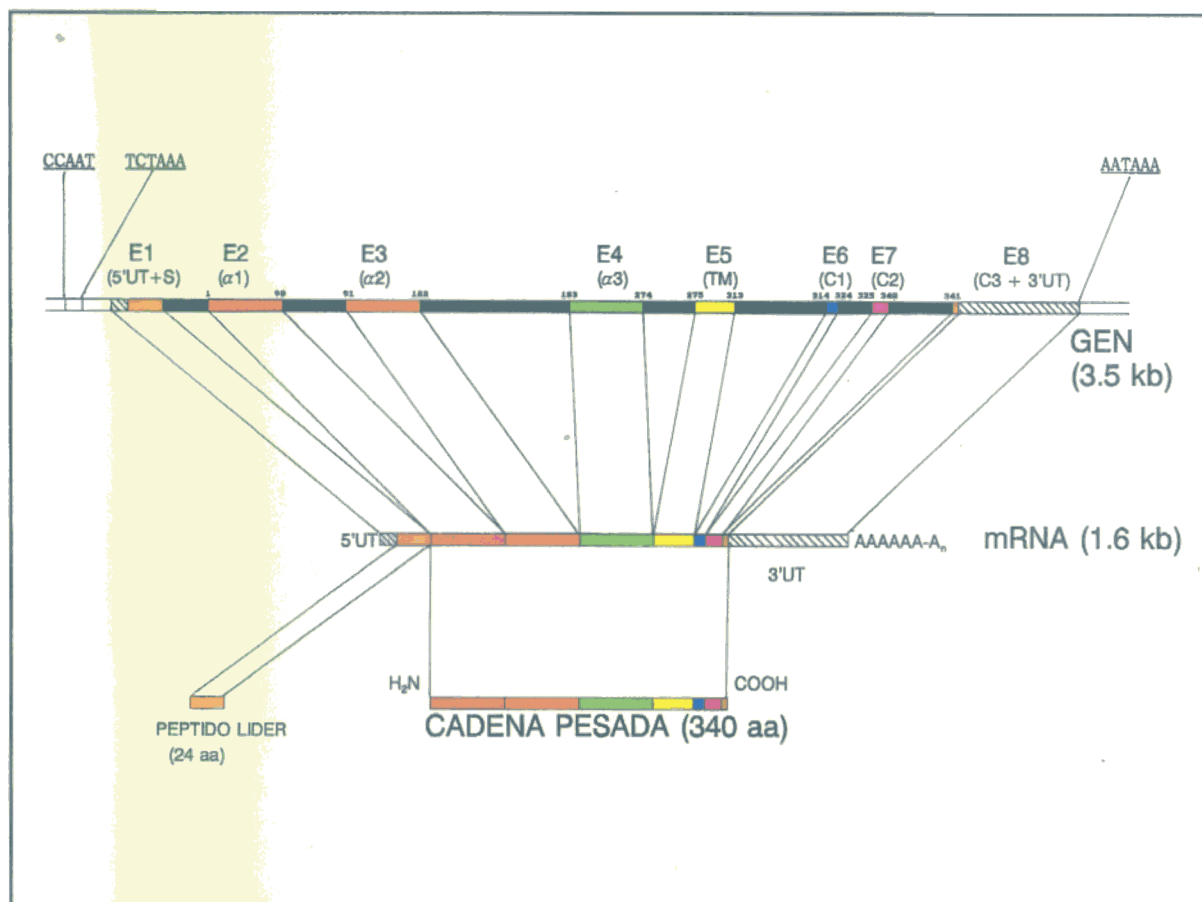


FIGURA 5. Estructura de los genes que codifican para la cadena pesada de los antígenos HLA de clase I clásicos. Se muestra la organización del DNA con intrones (negro) y exones (coloreados) y el procesamiento a RNA mensajero.

tanto para el control positivo como negativo de la expresión y la denominada IRS (del inglés: Interferon Response Sequences) (Burke y Ozato, 1989).

Una característica de los genes HLA de clase I es la homología de secuencias de nucleótidos entre los distintos alelos de la serie HLA-A en su región 3' UT que se diferencia claramente de la de los alelos de las series B y C (Jordan y col., 1985). Además existen zonas de secuencias conservadas no sólo entre genes clase I humanos sino con los de ratón (estudiados extensamente), tanto en intrones como en exones, pero que no son locus específicas y a las que se otorga un papel aún no definido (Srivastava y col. 1985). El análisis de las distintas secuencias conocidas correspondientes a distintos genes de clase I permite la diferenciación de "zonas variables" y "zonas homólogas"; hasta el 80% de los

cambios de bases dentro de las primeras lleva a cambios de aminoácidos, mientras que sólo lo hacen hasta el 35% en las últimas, siendo la frecuencia de mutaciones idéntica entre ambas (Srivastava y col., 1985). Los exones 2 y 3 son los más polimórficos, y coinciden con el 1° y 2° dominios externos proteicos; el exón 4, que codifica el 3° dominio (también exterior a la célula) es el más conservativo dentro de los grandes exones (Srivastava y col., 1985).

2.1.2.2 Los loci para antígenos clase I no clásicos (HLA-E, -F, -G, -H)

HLA-E (Koller y col., 1988) fue el primer gen de clase I diferente a A, B, C, que se reconoció oficialmente. Tres grupos diferentes lo caracterizaron, bien su secuencia

genómica (Koller y col., 1988; Srivastava y col., 1987) o su secuencia cDNA (Mizuno y col., 1988). Posteriormente fueron caracterizados y nombrados oficialmente los genes HLA-G (Geraghty y col., 1987), HLA-F (Geraghty y col., 1990) y HLA-H (Paul y col., 1987). El análisis de secuencias de estos 4 loci diferentes ha revelado que tienen exones intactos y por lo tanto pueden codificar, al menos potencialmente, para cadenas pesadas de antígenos de clase I (Figura 6).

HLA-E: La disposición de intrones y exones de HLA-E (Figura 6) recuerda en líneas generales a la de los genes clásicos de clase I. La diferencia más importante es la presencia de una delección de 5 nucleótidos en el exón 7 que producen un codón de terminación y una proteína de clase I con un aminoácido menos que las de los loci HLA-B y 4 menos que las de los loci HLA-A. En cuanto a los intrones se han encontrado 3 segmentos repetitivos Alu que no están presentes en otros genes HLA de clase I: el primero en la región 5' flanqueante del gen, el segundo en el intrón 5 y el tercero en la región 3'UT. En cuanto a las señales reguladoras se han encontrado la región CCAAT a -50 y la región TATAAA a -30 del punto de iniciación, pero curiosamente la variación TCTAAA de los genes de clase I clásicos se ve sustituida por la típica TATAAA en HLA-E como sucede en los genes de clase I murinos.

HLA-G: La organización exón/intrón de HLA-G es idéntica a la de los genes HLA-A, -B, -C (Figura 6). Sin embargo el gen HLA-G difiere de los genes clásicos en la existencia de un codón de terminación localizado en el segundo codón del exón 6. Por tanto, la mayor parte del sexto exón, así como los exones 7 y 8 completos no

van a ser traducidos a proteínas. En la región reguladora se encuentran las regiones CCAAT (-50) y TCTAAA, lo que significa que se han conservado los elementos promotores clásicos de los genes HLA-A y HLA-B.

HLA-F: En la tercera línea de la Figura 6 se observa la disposición de intrones y exones del gen HLA-F. Su organización y tamaño es similar a la de los genes HLA-A y HLA-B, presentando como diferencia más importante el cambio de la señal 3' de procesamiento del RNA al final del intrón 6 (AA en lugar de la secuencia conservada AG). Esta alteración al final del intrón 6 puede provocar que se pierdan todos los nucleótidos del exón siguiente (exón 7) durante el procesamiento del RNA para HLA-F. La región promotora de HLA-F tiene las señales CCAAT (-50) y TCTAAA (-30) conservadas de los genes de clase I clásicos.

HLA-H: La estructura genética de HLA-H es también similar a la de los genes de clase I clásicos y parece ser diferente de los genes HLA-E, HLA-F y HLA-G.

Recientemente (Bodmer y col. 1992) se ha asignado nombre oficial a un nuevo gen de esta familia: HLA-J (Ragoussis y col., 1989). Además se han determinado a nivel de DNA diferencias en las zonas flanqueantes, 5' y 3' UT (del inglés: UnTranslated) que se mantienen junto a grupos de alelos HLA de clase I: diferencias en el número de genes o pseudogenes en los diferentes haplotipos y diferencias en cuanto a secuencias reguladoras y mapas de restricción (Jordan y col., 1985, Srivastava y col., 1985)

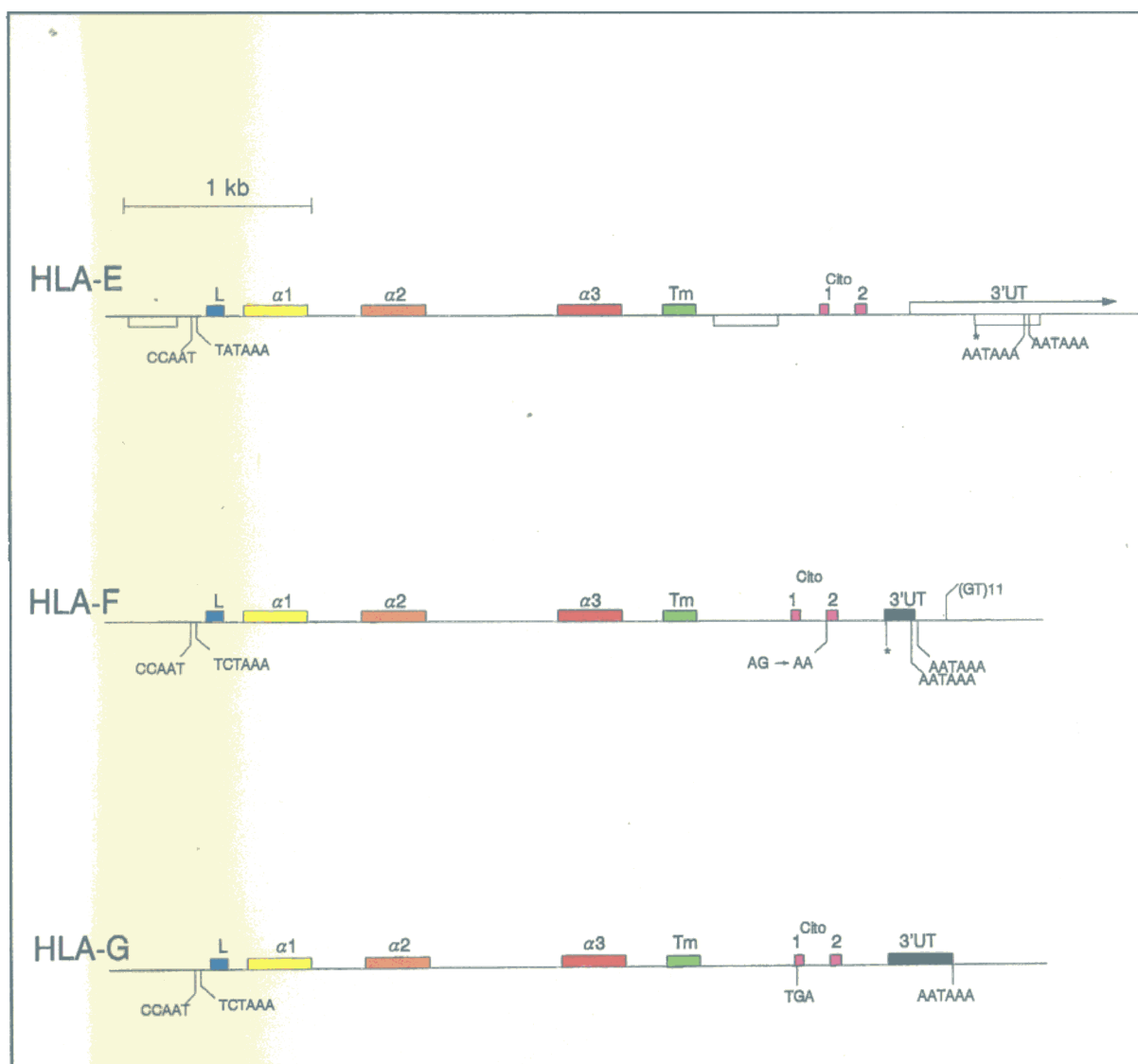


FIGURA 6. Organización de 3 de los genes de clase I no clásicos. Los exones (cajas coloreadas) se alternan con los intrones (líneas negras). Se marcan las señales de regulación y diferencias con respecto a los genes clásicos.

2.2 Antígenos de clase II:

El primer dato que apuntó la existencia de estos antígenos HLA fue el descubrimiento de la respuesta linfoproliferativa en cultivos mixtos de linfocitos (Hirschorn y col., 1963) que presentaban diferencias en sus antígenos HLA. Posteriormente se atribuyó esta respuesta linfocitaria a determinantes no detectados serológicamente, viéndose estas reacciones entre hermanos que eran HLA-A y -B idénticos (Bach y Amos, 1967). El sistema de antígenos HLA implicado se denominó HLA-D, resultando muy polimórfico. En el último Workshop de histocompatibilidad se han llegado a describir 26 variantes (Dupont, 1989; véase tabla 1), empleándose células homocigotas,

principalmente consanguíneas, y líneas celulares T primadas (PLT) para su identificación.

Posteriormente se identificaron antígenos estrechamente relacionados con aquellos HLA-D, denominándose HLA-DR (D Related), mediante inhibiciones de la respuesta linfocitaria en cultivos mixtos por sueros procedentes de múltiples o individuos inmunizados con leucocitos (van Leeuwen y col., 1973). También se identificaron por reacciones inesperadas de antisueros anti HLA-A ó -B con células procedentes de leucemias linfáticas crónicas de estirpe B (revisión Winchester y Kunkel, 1979). En la actualidad se ha reconocido la existencia de 18 variantes de estos antígenos (Dupont, 1989) mediante estudios

serológicos. Estos mismos estudios definieron antígenos que parecen representar especificidades públicas de los HLA-DR (Bodmer, 1978) y forman los llamados antígenos MT, MB, DC. Sin embargo, se esclareció que no eran tales antígenos DR públicos, sino verdaderas nuevas series antigénicas DR52/DR53 y DQ (Tanigaki y Tosi, 1982; revisión Möller y col., 1985). A la vez que se discernía la estructura y polimorfismo de los antígenos DR y DQ, se definió (Shaw y col., 1980) una nueva serie de antígenos HLA de clase II responsables de una respuesta secundaria acelerada en cultivos mixtos linfocitarios (SB ó DP actualmente).

2.2.1 Estructura de los antígenos de clase II

Las moléculas HLA de clase II son heterodímeros formados de una cadena pesada α (33-35 kd) y una ligera β (26-29 kd), estrecha, pero no covalentemente asociadas (Figura 7). Cada molécula α ó β presenta 4 dominios: 1. un dominio amino terminal más exterior ($\alpha 1$ y $\beta 1$) de 85-95 residuos; los dominios $\beta 1$ son todos polimórficos y en algún caso los $\alpha 1$ también ($DQ\alpha$, $DP\alpha$). 2. un dominio próximo a la membrana ($\alpha 2$ ó $\beta 2$) de aproximadamente 95 aminoácidos homólogo a las regiones constantes de las inmunoglobulinas. 3. un péptido conector (11-13 aminoácidos) y una región transmembranal (23 residuos). 4. una pequeña región intracitoplásmica (8-15 residuos) (Kaufman y col., 1984). Las distintas cadenas α estudiadas contienen 2 sustituciones de carbohidratos, mientras que las cadenas β sólo presentan una ramificación de oligosacáridos. Sin embargo, estas modificaciones post-traducción no influyen en el reconocimiento por aloantisueros de estas moléculas de clase II (Schackelford y Strominger, 1983). Estas cadenas α y β están asociadas con una tercer proteína (31 kd) no polimórfica (denominada CADENA INVARIANTE) durante su maduración citoplásmica, antes de la formación del heterodímero en la superficie celular (Kvist y col., 1982). Las moléculas HLA de clase II tienen una estructura similar

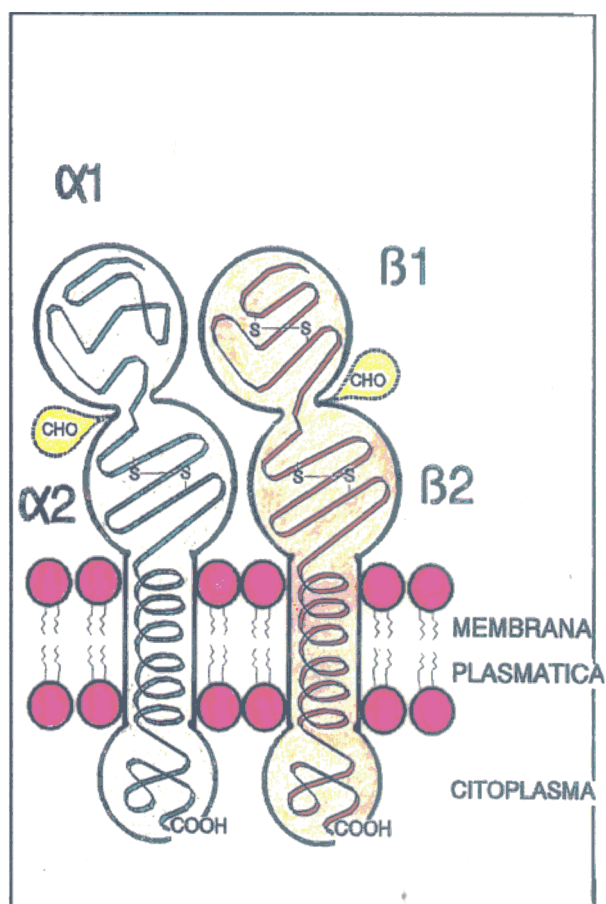


FIGURA 7. Representación esquemática de los antígenos de clase II. Los dominios de la cadena α se representan en verde y los de la cadena β en rojo.

a las de clase I. Los 2 dominios proximales a la membrana celular de cada cadena, $\alpha 2$ y $\beta 2$, son similares a los dominios constantes de las inmunoglobulinas, así como al dominio $\alpha 3$ de las moléculas clase I, y a la $\beta 2$ -m. En cuanto a los dominios amino-terminales, $\beta 1$ y $\alpha 1$, cabe esperar que formen el sitio de unión de péptidos antigénicos procesados, ya que la estructura de las moléculas clase I en sus dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de "dimerización intramolecular" es similar a la de "dímeros intermoleculares" en moléculas con varias subunidades, Figura 8 (Bjorkman y col., 1987; Brown y col., 1988).

Las moléculas HLA de clase II, al igual que las de clase I, permiten a las células T, a través de su receptor, reconocer antígenos polipeptídicos procesados, determinando una baja o alta respuesta inmune dependiente de su polimorfismo (Benacerraf, 1981; Nagy y col., 1981; Schwartz, 1985). Por tanto, la significación biológica del polimorfismo del

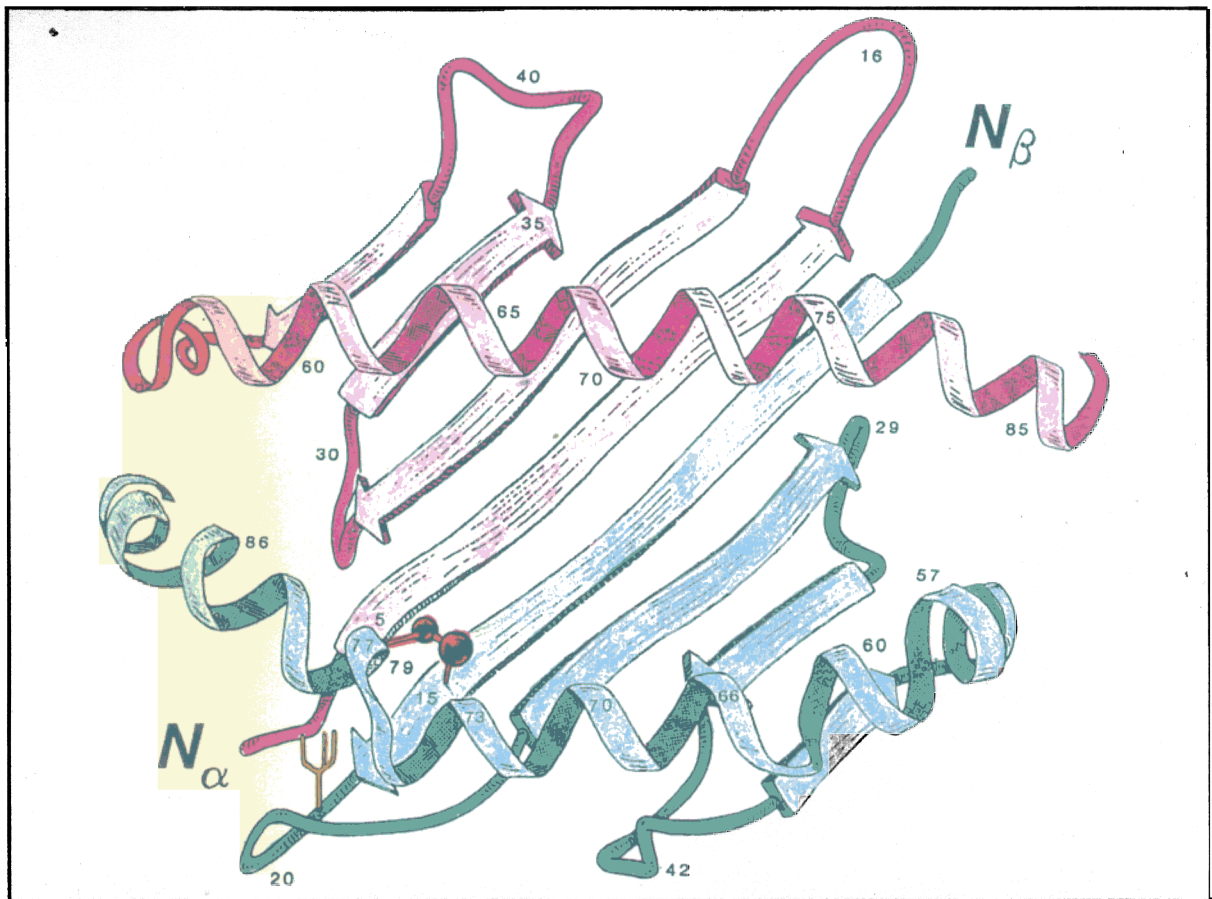


FIGURA 8. Modelo hipotético de la cavidad de unión de péptidos de los antígenos de clase II. La región aportada por el dominio $\alpha 1$ se representa en rosa y la aportada por el dominio $\beta 1$ en verde.

sistema MHC sería la capacidad que confiere a una población para rivalizar con una variedad de patógenos y, así, sobrevivir como especie.

cada una de ellas con al menos un gen para la cadena pesada (α) y otro para la cadena ligera (β) que se denominarán con las letras mayúsculas A y B, respectivamente.

2.2.2 Región de genes de clase II

El mapa actual de los genes HLA de clase II está representado en la figura 1, se extiende aproximadamente unas 900 kb y contiene diferentes tipos de genes funcionales, entre ellos los que codifican para los antígenos de clase II (Trowsdale y col., 1992).

2.2.2.1 Genes que codifican para antígenos de clase II

Entre los loci que codifican para antígenos HLA de clase II o serie HLA-D se pueden distinguir 5 subregiones o familias diferenciadas: DP, DN/DO, DM, DQ y DR,

LA SUBREGION HLA-DP: Es una de las regiones más estudiadas, se extiende unas 100 kb y contiene 2 pares de genes A y B (DPB2, DPA2, DPB1 y DPA1). Los genes DPA1 y DPB1 están orientados cabeza-cabeza con sus promotores separados tan sólo por una longitud de 2 kb. Estos genes se han estudiado en detalle y se conoce su secuencia (Kelly y Trowsdale, 1985; Lawrence y col., 1985). El gen DPB1 tiene la estructura clásica de los genes B de clase II (Figura 9), pero hay evidencias de algunos haplotipos con patrones de procesamiento diferentes que originan diferentes dominios intracitoplásmicos proteicos. Los

otros 2 genes de la región, DPB2 y DPA2, parecen ser pseudogenes por diferentes motivos, en los haplotipos en que se han estudiado (Serenius y col., 1984).

LA SUBREGION HLA-DN/DO: Los genes HLA-DNA y -DOB se localizaron en sus posiciones presentes por electroforesis de campo pulsante, PFGE (del inglés: Pulsed Field Gel Electrophoresis). Estos estudios demostraron que el gen DNA (Trowsdale y Kelly, 1985) se situaba próximo a la subregión DP, en tanto que el gen DOB (Tonelle y col., 1985) estaba más próximo a la subregión DQ. Pero, además, los estudios de PFGE demostraban que la distancia entre DNA y DOB era superior a 100 kb y por lo tanto parecía poco probable que sintetizaran cadenas capaces de generar heterodímeros α/β . Sin embargo, muy recientemente se han encontrado proteínas heterodiméricas con los productos de estos dos genes.

LA SUBREGION HLA-DM: Los dos loci de esta subregión, DMA y DMB, se han localizado en el sistema HLA muy recientemente (Kelly col., 1991) situados físicamente entre los loci de DNA y DOB. Su caracterización ha sido posible tras su hallazgo previo en el MHC del ratón, utilizando posteriormente sondas de ratón sobre una librería de cDNA humano. A diferencia de los otros genes de clase II, parecen presentar un polimorfismo muy restringido o nulo y la comparación de su secuencia con la de los genes de clase I y II los sitúa en una posición intermedia. Del mismo modo, la estructura proteica de los productos de estos genes sería ligeramente diferente a la del resto de los antígenos de clase II. Principalmente, porque en los 2 dominios más externos hay aminoácidos que pueden formar múltiples puentes disulfuro.

LA SUBREGION HLA-DQ: la subregión DQ contiene 5 genes diferentes: DQA1, DQB1, DQA2, DQB2 y DQB3. Los genes funcionales de esta región, DQA1 y DQB1 (Okada y col., 1985), se disponen también cabeza-cabeza y no hay evidencia hasta el momento de la expresión de los otros 3 genes de la región. Los genes DQA2 y DQB2 (Jonsson y col., 1987) poseen secuencias intactas y no hay datos que demuestren que son pseudogenes. El gen DQB3 ha sido descubierto más recientemente (Ando y col., 1989) pero tampoco hay evidencias de su expresión.

LA SUBREGION HLA-DR: ha sido estudiada por diferentes grupos (Spies y col., 1985; Rollini y col., 1985; Meunier y col., 1986). El consenso de los datos indica que hay dos genes DRB expresados en la mayoría de los haplotipos (DRB1 y DRB3 ó DRB4 ó DRB5) y un numero variable de pseudogenes. Excepción a estos datos son los haplotipos DR1, DR8 y DR10 en los que sólo se expresa un gen (DRB1). Los pseudogenes se han definido así por tener delecciones o codones de stop (DRB2, DRB7 y DRB8) pero se considera que pueden tener un papel importante en mecanismos de conversión génica y no se sabe si son totalmente afuncionales.

ESTRUCTURA DE LOS GENES DE CLASE II: Como en otros genes eucariontes y de modo parecido a lo que sucede en los antígenos de clase I, hay una correspondencia entre los exones de los genes y los dominios de las proteínas maduras. En la figura 9 se muestra el mapa esquemático típico de los genes de clase II. Así, las cadenas α se sintetizan por 5 exones, incluyendo una región 5' UT y el péptido líder, los exones para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y un exón 4 para el péptido conector, la región transmembranal, el dominio

citoplásmico y parte de la región 3'UT. El exón 5 codifica para el resto de la región 3'UT. Hay algunas variaciones en los genes de las distintas subregiones, así, por ejemplo RNA mensajero de DQA1 difiere en longitud de los RNAs mensajeros que se detectan en el resto de los genes y, también, en la región 3'UT; en el gen DNA el condon de estop se localiza en el exón 5.

De modo similar, las cadenas β se codifican por un exón para el péptido líder, dos exones para los dominios proteicos $\beta 1$ y $\beta 2$, un cuarto exón para el péptido conector, el dominio transmembranal y parte del dominio citoplasmático. Sin embargo, el resto del dominio citoplasmático se codifica en al menos 2 exones más, con alguna variación en las diferentes subregiones.

Los tamaños de los intrones difieren notablemente, siendo el mayor de varias kilobases, el que separa el exón del péptido señal con el que codifica para el dominio $\alpha 1$. En los genes B además hay un exón de gran tamaño, el que separa los exones que codifican para los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$. El intrón más pequeño encontrado se sitúa en el gen DNA a continuación del exón que codifica para el dominio $\alpha 2$ con una longitud de tan sólo 180 bases.

En cuanto a elementos reguladores de las regiones promotoras, los genes de clase II parece que tienen diferentes características a las del resto de los genes eucariontes. Los elementos típicos como son las regiones "CAT" y "TATA" parecen estar presentes. Pero

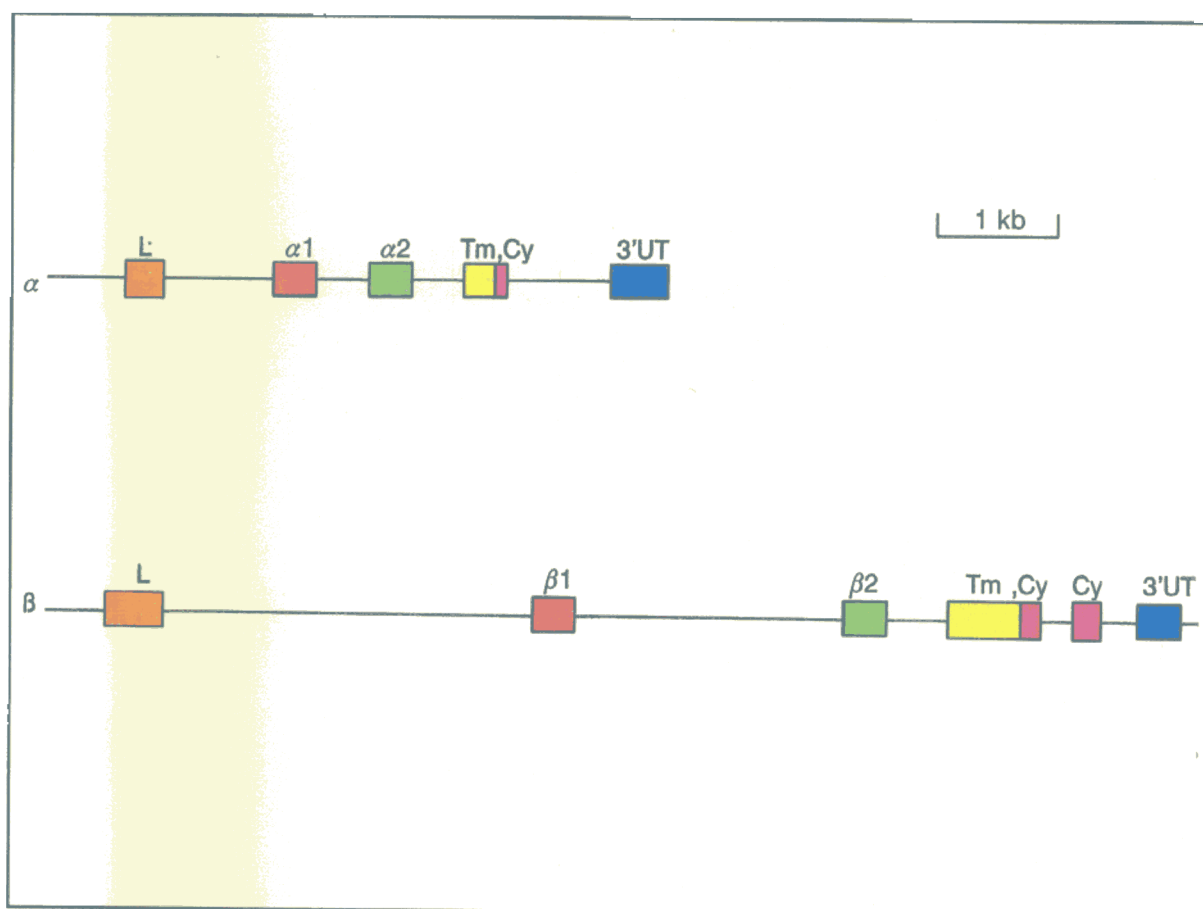


FIGURA 9. Organización de los genes que codifican para las moléculas HLA de clase II. Los exones (cajas coloreadas) se sitúan entre los intrones (líneas negras).

por ejemplo, el candidato a la región "TATA" del gen DPB1 se ha visto que forma parte del exón 5'UT. De modo similar, la posible secuencia consenso "CAT" está demasiado próxima al sitio de iniciación de la transcripción para considerarse equivalente a la encontrado en las regiones promotoras convencionales (Trowsdale, 1987).

2.2.2.2 *Genes que codifican para otras proteínas*

Trabajos muy recientes han localizado nuevos genes en esta región que no codifican para antígenos de clase II. Hay un grupo de genes centromérico a HLA-DP que incluye un gen de colágeno (tipo 11A2) y 5 genes de función desconocida (Abe y col., 1988; Freemont y col., 1991; Hanson y col., 1991; Hanson y col., 1989). Al ser centroméricos a HLA-DP puede que no tengan ninguna relación con el Complejo Principal de Histocompatibilidad, pero está por discernir. Más interesante resulta, desde un punto de vista inmunológico, otro grupo de genes

que se localizan entre los loci HLA-DNA y -DOB. Hay al menos 3 tipos de genes diferentes: (1) Los primeros no tienen relación aparente con el sistema inmune y por ejemplo RING3 es homólogo a un gen de *Drosophila* que controla la esterilidad de las hembras (Hanson y col., 1991). (2) los nuevos genes de clase II, DMA y DMB (Kelly y col., 1991), ya mencionados y (3) un tercer grupo de genes que codifican proteínas involucradas en el procesamiento de los antígenos, LMP1 y LMP2 (Kelly y col., 1991b; Glynnne y col., 1991) o en el transporte de péptidos hacia el retículo endoplásmico, TAP1 y TAP2 (Trowsdale y col., 1990; Spies y col., 1990, Spies y col., 1991; Powis y col., 1992). En la figura 10 se representa esquemáticamente el papel que se supone realizan los productos proteicos de estos nuevos genes, LMP y TAP, en el procesamiento de los antígenos que van a ser presentados por los genes de clase I (Robertson, 1991).

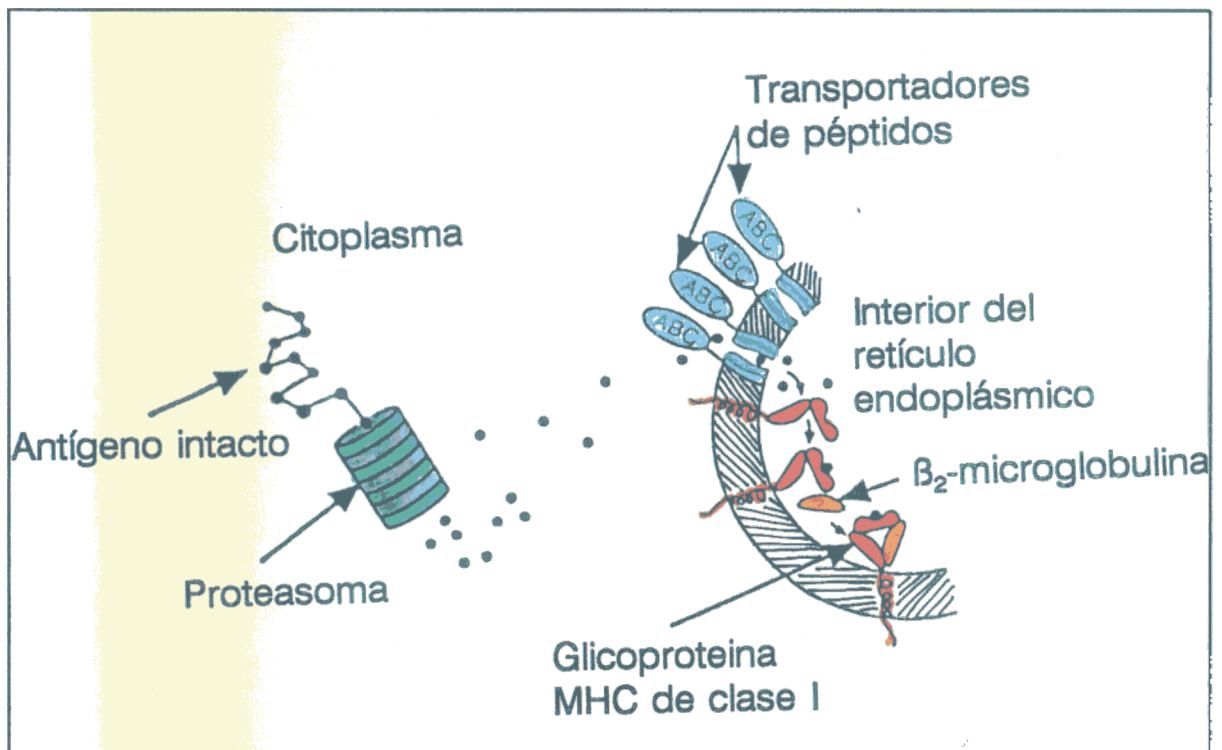


FIGURA 10. Procesamiento de antígenos: papel hipotético que se les atribuye a los transportadores de péptidos (codificados por los genes TAP) y a las enzimas del proteasoma (codificadas por los genes LMP).

2.3 Proteínas y genes de clase III

La región de genes denominados de clase III se sitúa físicamente entre las regiones de clase I y clase II, ocupa unas 800 kb y contiene, al menos, más de 36 genes diferentes. Mientras que las regiones de clase I y II contienen genes para los antígenos de trasplante, la región de clase III contiene genes no relacionados con dichos antígenos ni con la presentación de péptidos. Alguno de los genes de esta región tienen un polimorfismo moderado en contraste con el alto polimorfismo observado en los genes de clase I y clase II (White., 1989). Podemos considerar diferentes grupos de genes en esta región:

2.3.1 Los genes del complemento y sus productos proteicos:

La función de C2, C3, C4 y Bf en la activación del complemento puede verse en la figura 11 de forma esquemática. Cabe resaltar que las dos vías de activación del C3 y C5 tienen una especificidad y actividades catalíticas similares. Los componentes C3 y C4 están tanto estructural como funcionalmente relacionados. Las dos proteínas son glicoproteínas sintetizadas como una única cadena polipeptídica de 180-200 kd. Antes de su secreción por la célula que las sintetiza son procesadas rindiendo 2 cadenas (α 110 kd; β 75 kd) en el caso del C3, y 3 cadenas (α 90 kd; β 70 kd; τ 30 kd) en el del C4. Su activación lleva a la liberación de un péptido aminoterminal de aproximadamente 80 residuos de sus correspondientes cadenas α , con lo que quedaría expuesto un enlace intracatenario tipo éster. C3, C4 y C5 presentan una secuencia homóloga que hace pensar en una evolución procedente de un gen ancestral común (Porter, 1985).

Las moléculas del Bf y C2 son

también glicoproteínas sintetizadas y secretadas como una única cadena peptídica de 90-100 kd. Las dos son serín-proteasas no clásicas en las que las cadenas catalíticas formadas tras su activación son de aproximadamente 60 kd (carboxilo-terminal). Como en el caso del C3, C4 y C5, los componentes C2 y Bf son muy similares estructuralmente, aunque la homología en sus secuencias nucleotídicas sólo sea de un 35% (Porter, 1985).

El número de alelos de cada locus varía entre las 4 variantes del C2 (Meo y col., 1977), 11 del Factor B (Mauff, 1986), 13 para el C4A, y las 22 variantes en el locus C4B (Mauff y col., 1983). En todos los loci se han descrito alelos nulos, delección o no expresión, aunque en el Bf nunca en homocigosis (Bertrams y Mauff, 1985). Utilizando sondas de cDNA (complementary DNA) se ha logrado construir el mapa genómico de estos genes y su orden (Figura 1): C2-Bf-C4A-C4B en un segmento de 98 kb (Carrol y col., 1984). El orden de estos genes HLA de clase III con respecto a HLA-B sería HLA-B-C2-Bf-C4A-C4B-HLA-DR (Olaisen y col., 1983; Carrol y col., 1984; Marshall y col., 1984; Abbal y col., 1987; Carrol y col., 1987).

El altísimo polimorfismo hallado en los antígenos HLA de clase I, II y III se encuentra en parte limitado por un fenómeno de agrupación de variantes. Es el denominado "desequilibrio de ligamiento" (Awdeh y col., 1983) por el que se ha observado la asociación de alelos particulares juntos, en un mismo cromosoma o "haplotipo extendido", con una frecuencia mayor a la esperada según la frecuencia individual de los alelos en la población general.

Dentro de los antígenos HLA de clase III, en C4 se ha encontrado, al igual que en la región DR de clase

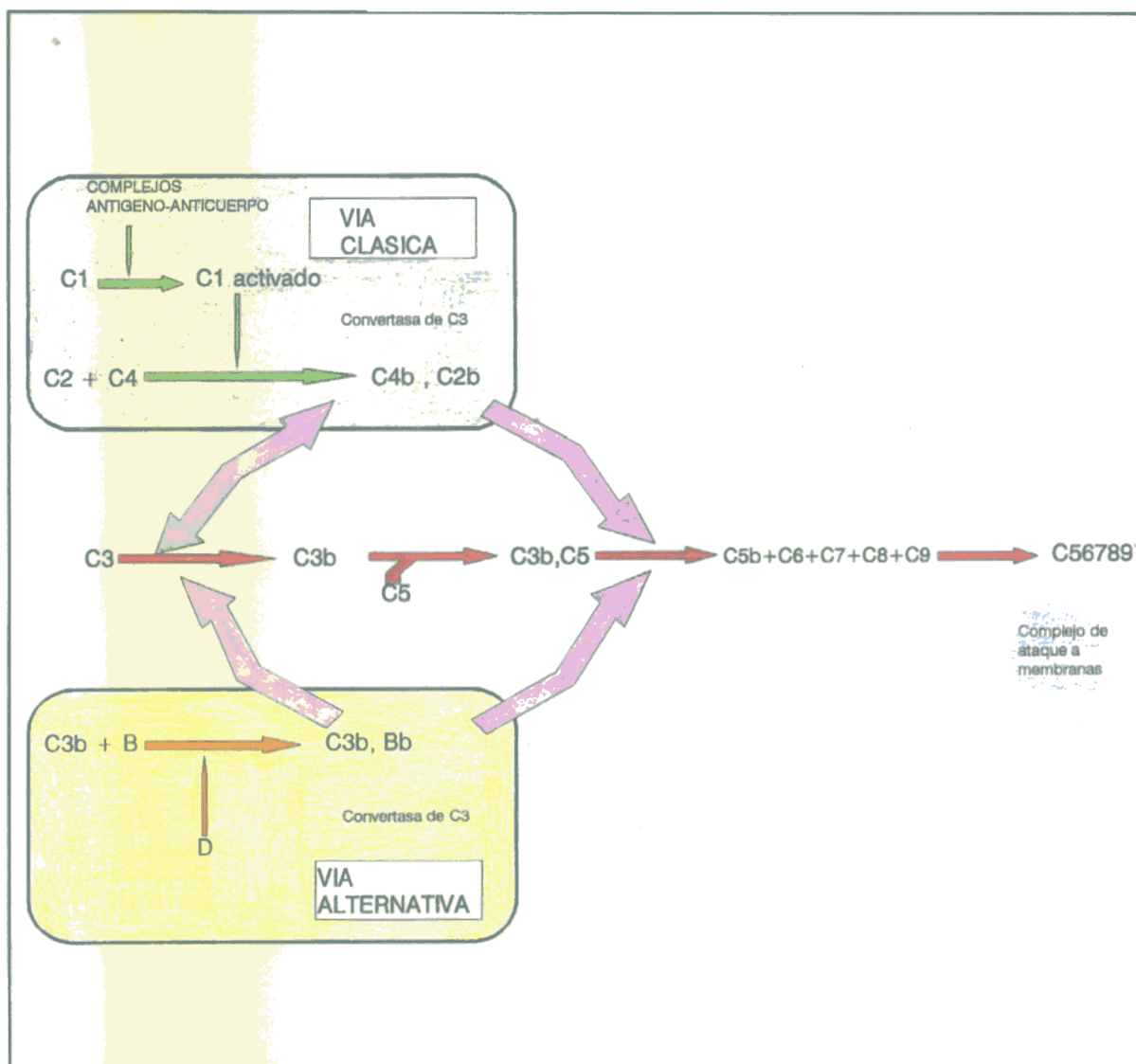


FIGURA 11. Pasos fundamentales en la cascada de activación del complemento. Se observa que las proteínas codificadas en la región HLA (C2, C4 y Bf) juegan un papel importante en la cascada de activación: la activación del componente C3.

II, polimorfismo del número de genes, tanto con la aparición de deleciones como de duplicaciones (Mauff y col., 1990). Los alelos nulos del C4 parecen ser debidos a 3 distintos fenómenos: 1. deleción de cualquier gen C4A ó C4B, que usualmente ocurre junto a la deleción del gen de la 21-hidroxilasa que le acompaña (21-OHA ó 21-OHB) (Carrol y col., 1985). 2. no expresión de genes con alguna mutación aún no establecida. 3. expresión de alelos idénticos en los dos loci del C4 por homoduplicación (Yu y Campbell, 1987).

La deficiencia de C2 es el desorden genético más frecuente de las proteínas del complemento en el hombre (Mortensen y col., 1980). En los individuos con esta deficiencia se

desarrollan habitualmente (aproximadamente en el 40% de los casos) enfermedades relacionadas con inmunocomplejos (Rynes, 1982). La base por la que estos individuos enfermarían parece estar relacionada con la observación de que la solubilización y aclaramiento de inmunocomplejos requeriría un depósito efectivo de moléculas activadas del C3 en aquellos mismos complejos (Takahashi y col., 1980).

En el C4 se ha descrito una diferencia funcional entre los dos isotipos C4A y C4B, en su capacidad hemolítica tras su separación electroforética en muestras desializadas (Awdeh y Alper, 1980).

Las moléculas de C4B son mucho más hemolíticas que las de C4A. Esta diferente funcionalidad es debida a que C4B se une de 2 a 3 veces más rápidamente mediante un enlace éster (grupo acilo) a polisacáridos (membrana celular) o glicerol, mientras que sucede lo contrario en cuanto a la unión a proteínas mediante un enlace amido (Isenman y Young, 1984; Law y col., 1984).

La molécula de proC4 contiene un total de 1722 aminoácidos en los que sólo aparecen 15 cambios entre los dos isotipos y sus diferentes variantes alélicas. Sin embargo, este número tan pequeño de variaciones en la estructura primaria serían las responsables, al menos aparentemente, de las numerosas diferencias en la reactividad de la unión tioéster, en la carga eléctrica y en la antigenicidad (grupos sanguíneos Chido y Rodgers) de los diferentes alelos del C4 (Porter, 1985). El rango de reactividad encontrado entre los distintos alelos e isotipos del C4 junto con el hecho de que una mayoría de individuos son heterocigotos para C4 y tienen entre 3 y 5 formas distintas de C4 en circulación, podría ser ventajoso al asegurarse una activación rápida del complemento en presencia de microorganismos extraños con diferentes estructuras en su superficie. Además, la carencia de esta heterocigosidad podría ser ocasionalmente desventajosa, aumentando el riesgo de fenómenos autoinmunes o de patologías por inmunocomplejos (Porter, 1985).

Estos tres componentes del complemento, C2, C4 y Bf, están codificados por genes dentro del MHC del hombre, ratón, y sin duda de muchos mamíferos. En el genoma se encuentran asociados tan estrechamente que no se han encontrado sobrecruzamientos entre ellos (Porter, 1985). Las moléculas de C2 y Bf están codificadas por un

único gen, mientras que las del C4 lo están por, al menos dos genes próximos entre sí (O'Neill y col., 1978), aunque hay variabilidad de unos haplotipos a otros con respecto al número de genes de C4. Los dos genes de C4, C4A y C4B, están separados por 10 Kb y situados a 30 kb de distancia de un único gen del factor B y de C2.

Los genes de C2 y Bf están muy próximos, de modo que el extremo 3' del gen de C2 queda a tan sólo 421 bases del punto de iniciación de transcripción del gen de Bf. El gen del factor B se extiende 6 kb en tanto que el de C2 ocupa 18 kb. La gran diferencia de longitud entre estos dos genes se debe a diferente longitud de sus intrones, ya que los RNAs mensajeros y las proteínas son muy similares tanto estructural como funcionalmente. Se piensa que estos dos genes provienen de la duplicación de un gen ancestral que debió ocurrir hace ya mucho tiempo, puesto que sus productos proteicos sólo presentan una homología del 39%.

Los 2 genes para C4, C4A y C4B, presentan, en cambio, una homología de un 99% y se cree que proceden de una duplicación más reciente. Los RNAs mensajeros son de 5,5 kb de longitud y la región genómica que ocupan puede ser de 16 o 22 kb (formas "cortas" o "largas" del gen) en el caso de C4B y de 22 Kb en el caso de C4A. Esta diferencia de longitud se debe a una delección de 7 kb en uno de los intrones del gen (Carroll y col., 1985). La estructura genómica completa se ha descubierto recientemente (Yu y col., 1991) y se sabe que el gen consta de más de 28 exones e intrones (Figura 12).

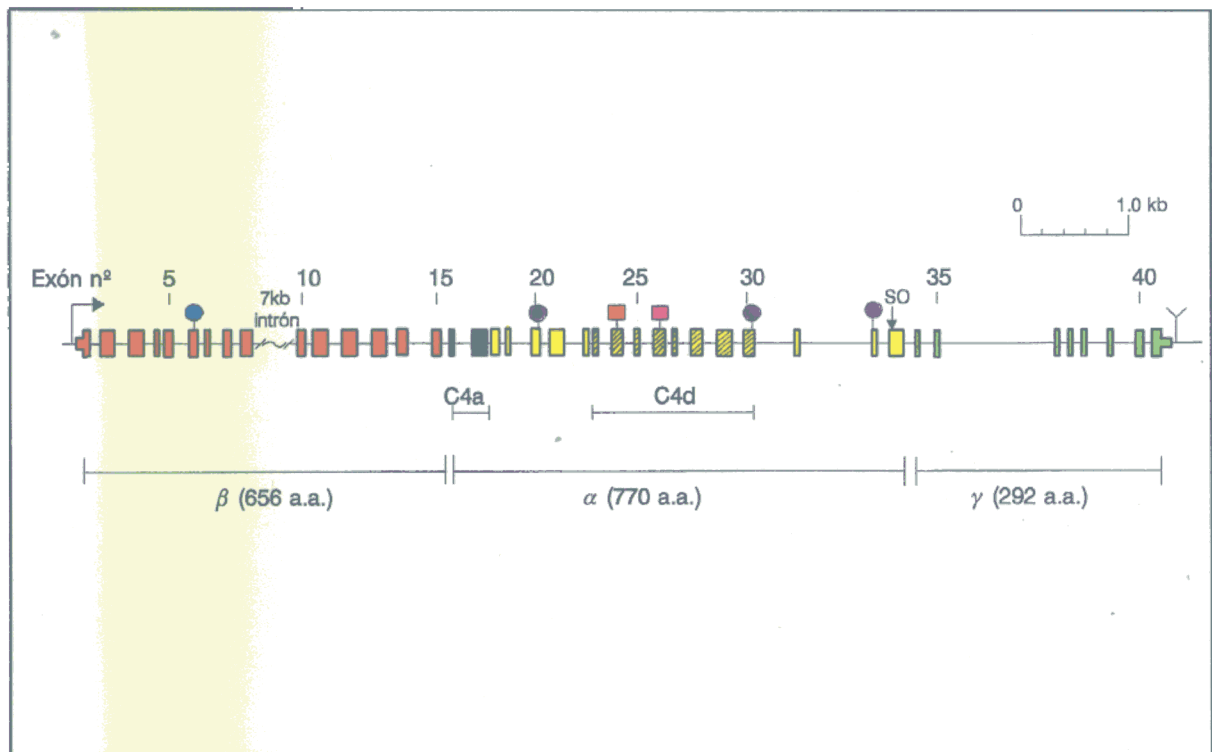


FIGURA 12. Organización intrón/exón del gen de C4 humano.

2.3.2 Genes para linfocinas: TNF

Los Factores de necrosis tumoral (TNF α y β) son secretados por los macrófagos y linfocitos T durante la respuesta inflamatoria, respectivamente. TNF α , como otras linfocinas (interferon, interleucina-1) tiene un amplio rango de efectos en las células implicadas en respuestas inflamatorias: activación de linfocitos T y B, estímulo de producción de radicales tóxicos del oxígeno en granulocitos. También se ha comprobado que tiene un efecto citotóxico directo sobre células tumorales; por último, TNF α parece estimular la transcripción de los genes de clase I, modulando por tanto la respuesta inmune.

TNF β debe tener propiedades muy similares a TNF α , aunque se caracterizó inicialmente por su acción citotóxica "in vitro" frente a determinadas líneas celulares. TNF α se produce "in vitro" por macrófagos estimulados con lipopolisacáridos bacterianos, en tanto que TNF β lo producen linfocitos activados por

diferentes mitógenos.

TNF α es una cadena polipeptídica sintetizada en forma de pro-TNF α , con un péptido líder de 76 aminoácidos. La proteína madura contiene 156 residuos y tiene un peso molecular de 17 KD; su RNA mensajero correspondiente tiene 1.6 Kb. En tanto que TNF β es codificado por un mensajero de 1.3 Kb, y la proteína sintetizada tiene un péptido señal de 34 residuos; la forma secretada tiene 171 aminoácidos y un peso molecular de 19 kD. TNF β se glicosila "in vivo", de modo que el peso real observado es de 25 kD. La homología entre estas dos proteínas es de un 35%.

Estas linfocinas están codificadas por dos genes, TNFA y TNFB, que se sitúan en la región de clase III del sistema principal de histocompatibilidad (White., 1989). Cada uno de los genes TNF es de 3 kb de longitud y contiene 3 intrones. La presencia de estos genes dentro del sistema HLA fue demostrada por la técnica de Southern-blot. Estos experimentos localizaron la presencia de los genes TNF en la región entre

2.3.3 Genes para enzimas: 21-hidroxilasa (CYP21)

La hormona esteroide cortisol es sintetizada, a partir del colesterol, en el cortex adrenal por mediación de 5 pasos enzimáticos, 3 de los cuales suponen hidroxilaciones en las posiciones 11, 17 y 21. La hidroxilasa de la posición 21 es un citocromo P450 y el RNA mensajero que la codifica tiene una longitud de 2 kb. Su estructura genómica es bastante compacta, conteniendo 10 exones en una longitud total de 3.1 kb. El gen de la CYP21B, que es el funcional, se localiza muy próximo al de C4B y se transcribe en la misma dirección. El gen CYP21A, se sitúa de modo análogo muy próximo al de C4A (Carroll y col., 1985b). Aunque los genes CYP21A y CYP21B son homólogos en el 98% de los exones, el gen CYP21A es un pseudogen debido a varias mutaciones deletéreas.

2.3.4 Genes para proteínas de shock: HSP70 (Hsp70-1, -2, -HOM):

Se han encontrado hasta el momento 3 copias del gen para las proteínas principales inducidas por shock térmico, HSP70 (del inglés: Heat Shock Proteins). Estos genes fueron mapeados a unas 32 kb del gen de C2 (Sargent y col., 1989b). Como los análogos de HSP70 resultan ser antígenos muy comunes en infecciones bacterianas y protozoarias, este hallazgo puede tener grandes implicaciones con respecto a las enfermedades asociadas al sistema HLA. Ya que la exposición a los análogos de la HSP70 puede suponer alteraciones en el sistema inmune en cuanto a la diferenciación entre lo propio y lo no propio.

Estudios muy recientes (DeNagel y Pierce, 1992) han demostrado que el ensamblaje entre los péptidos procesados y las moléculas HLA de clase II por las células presentadoras de antígenos es

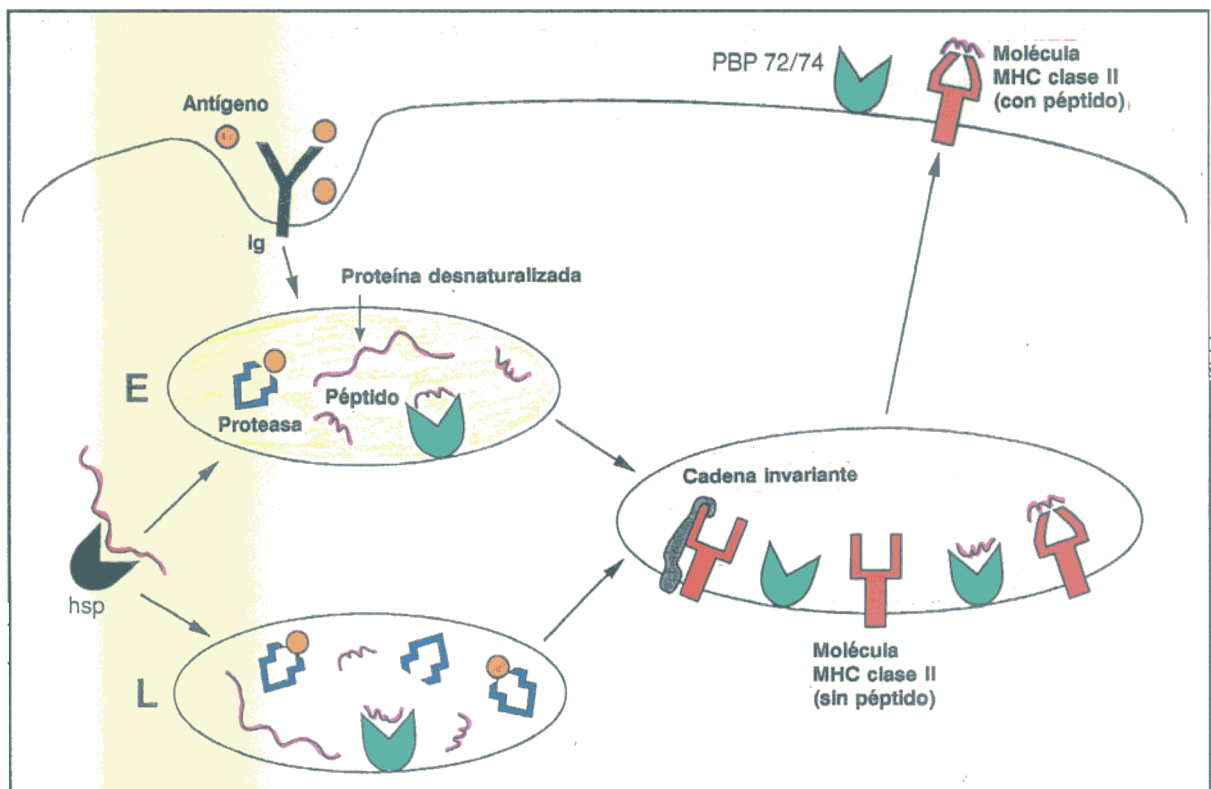


FIGURA 13. Acciones postuladas para las proteínas Hsp-70 y miembros de la familia de las chaperoninas durante el procesamiento de péptidos que van a ser presentados por antígenos de clase II.

mucho más eficaz que el que se podría predecir por estudios de unión de péptidos a antígenos clase II purificados. Una posible explicación de esta discrepancia es que alguna proteína catalice positivamente este proceso dentro de las células presentadoras de antígeno. Las proteínas propuestas para esta función son las Hsp-70 y otros miembros de su familia (familia de las "chaperoninas"), y el mecanismo propuesto se esquematiza en la figura 13.

2.3.5 Genes para proteínas con elementos repetitivos: RD y OSG:

El gen RD se identificó primeramente en el MHC de ratón y utilizando sondas de cDNA se localizó su posición en el sistema HLA. La proteína para la que codifica tiene 42 kD y no presenta homología con ninguna otra proteína conocida. Pero el polipéptido deducido de la secuencia de cDNA tiene una alta proporción de residuos cargados y carece de señal hidrofóbica y de péptido líder. Por tanto, esta proteína no va a ser secretada y no va a estar localizada en membranas celulares o mitocondriales. Su nombre deriva de la existencia de 52 repeticiones de un dipéptido en su región proteica central que suele ser arginina (R) - ácido aspártico (D). El gen RD (Levi-Strauss y col., 1988) se transcribe en dirección opuesta a como lo hacen C2 y C4. Recientemente se ha localizado otro gen que codifica la hebra opuesta del CYP21B, denominado OSG (del inglés: Opposite Strand Gene) y cuya proteína está caracterizada por la presencia de 3 segmentos repetitivos de una longitud e 100 aminoácidos (Morel y col., 1989).

2.3.6 Genes para proteínas de función desconocida: BAT y G:

Trabajos recientes (Spies y col., 1989) han localizado un grupo de genes en la zona del MHC que se sitúa entre el locus HLA-B y los genes de complemento, por lo tanto dentro de la región de clase III. Este grupo, que contiene un mínimo de 8 loci diferentes se ha denominado BAT (del inglés B Associated Transcripts) ó genes G, dependiendo del grupo que los ha ido describiendo, y se han numerado del 1 al 18. La estructura y función de dichos genes sigue siendo desconocida hasta el momento presente. Pero su localización en las proximidades del locus HLA-B nos puede hacer preguntarnos si las asociaciones que se han encontrado de enfermedades con alelos del locus B (como HLA-B27 con la espondilitis anquilosante) es debida a los productos del locus B en sí o a genes próximos. Dentro de esta última posibilidad, los genes BAT podrían tener alguna respuesta cuando se conozca su función. Los genes G que son coincidentes con los BAT, son también de función desconocida en su mayoría. Dos de ellos, como G2 y G3 se corresponden con BAT2 y BAT3, codifican para proteínas ricas en prolina. El gen G7a codifica para la sintetasa del vanil-tRNA (Sargent y col., 1989; Spence y col., 1989).

3. Polimorfismo del sistema HLA:

El sistema HLA es extremadamente polimórfico; es decir, presenta una elevada cantidad de variantes alélicas para cada uno de sus loci genéticos. Esta característica hace que dos individuos, sin ser parientes, tengan escasísimas posibilidades de ser HLA-identícos, por no decir nulas. Además del polimorfismo dentro de los loci, existe en algunos casos, el polimorfismo denominado de "dosis" génica, pues también puede haber variaciones en el número de genes en diferentes cromosomas.

Finalmente, con el desarrollo de las diferentes técnicas de "tipificación" del sistema HLA, se ha ido observando un polimorfismo cada vez mayor, según se profundizaba progresivamente en el conocimiento del sistema. Así, el número de variantes que se detectan por serología es menor que las que se detectan por fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), que a su vez es menor que el que se puede detectar si se secuencian el DNA de los diferentes alelos.

3.1 Polimorfismo serológico del sistema HLA:

Para que un alelo sea reconocido por las técnicas de serología es necesario que haya disponibles a nivel internacional sueros policlonales o monoclonales que permitan el reconocimiento de dicha especificidad en diferentes laboratorios. Estas nuevas especificidades se reconocen cada cuatro años en los Talleres internacionales de Histocompatibilidad (Dupont, 1989; Bodmer y col., 1992). La lista más completa y reciente de especificidades serológicas reconocidas se recoge en la Tabla 1 (Bodmer y col., 1992). De los loci citados en la tabla, sólo HLA-A, -B, -C, -DR y -DQ se tipifican por las técnicas de microlinfocitotoxicidad estandar, en tanto que Dw se tipifica en cultivo

mixto de linfocitos frente a un panel de células homocigotas de tipaje y DP en respuesta a cultivo secundario.

El comité internacional de Histocompatibilidad ha decidido asignar sólomente nombre oficial a aquellos patrones de reacción serológicos que correlacionen con secuencias de DNA, ya que puede haber patrones de reacción cruzada entre diferentes antígenos, por compartir estos los denominados "epítomos" o pequeñas trozos de secuencia de aminoácidos dentro del antígeno.

Concentrándonos en la región DR, se observa en la Tabla 1, que hay al menos 21 variantes del locus principal, HLA-DRB1, numeradas del 1 al 18, siendo alguna de ellas subdivisiones que se han encontrado recientemente de otras definidas antaño (como DR11 y DR12 que son subtipos de DR5; por tanto DR5 no es en sí un alelo, sino un conjunto de alelos diferentes).

3.2 Polimorfismo genético de restricción (RFLPs)

Con la introducción en 1975 de la tecnología de Southern (Southern, 1975), se pudieron comenzar a estudiar los denominados polimorfismos de "presencia/ausencia" de lugares de restricción (es decir fragmentos específicos de secuencia que son reconocidos por endonucleasas de restricción). Si en un DNA determinado estaba presente el lugar de reconocimiento para la enzima, ésta cortaba y al revelar con una sonda para el gen en estudio se observaba un patrón de fragmentos diferente que si el lugar específico para dicha enzima estaba ausente. En el fondo, este tipo de tecnología es

Tabla 1
Especificidades HLA reconocidas, 1992

A	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	Cw9(w3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	Cw10(w3)	Dw10	DR9		
A24(9)	B18		Dw11(w7)	DR10		
A2403	B21		Dw12	DR11(5)		
A25(10)	B22		Dw13	DR12(5)		
A26(10)	B27		Dw14	DR13(6)		
A28	B35		Dw15	DR14(6)		
A29(19)	B37		Dw16	DR1403		
A30(19)	B38(16)		Dw17(w7)	DR1404		
A31(19)	B39(16)		Dw18(W6)	DR15(2)		
A32(19)	B3901		Dw19(w6)	DR16(2)		
A33(19)	B3902		Dw20	DR17(3)		
A34(10)	B40		Dw21	DR18(3)		
A36	B4005		Dw22			
A43	B41		Dw23	DR51		
A66(10)	B42					
A68(28)	B44(12)		Dw24	DR52		
A69(28)	B45(12)		Dw25			
A74(19)	B46		Dw26	DR53		
	B47					
	B48					
	B49(21)					
	B50(21)					
	B51(5)					
	B5102					
	B5103					
	B52(5)					
	B53					
	B54(22)					
	B55(22)					
	B56(22)					
	B57(17)					
	B58(17)					
	B59					
	B60(40)					
	B61(40)					
	B62(15)					
	B63(15)					
	B64(14)					
	B65(14)					
	B67					
	B70					
	B71(70)					
	B72(70)					
	B73					
	B75(15)					
	B76(15)					
	B77(15)					
	B7801					
	Bw4					
	Bw6					

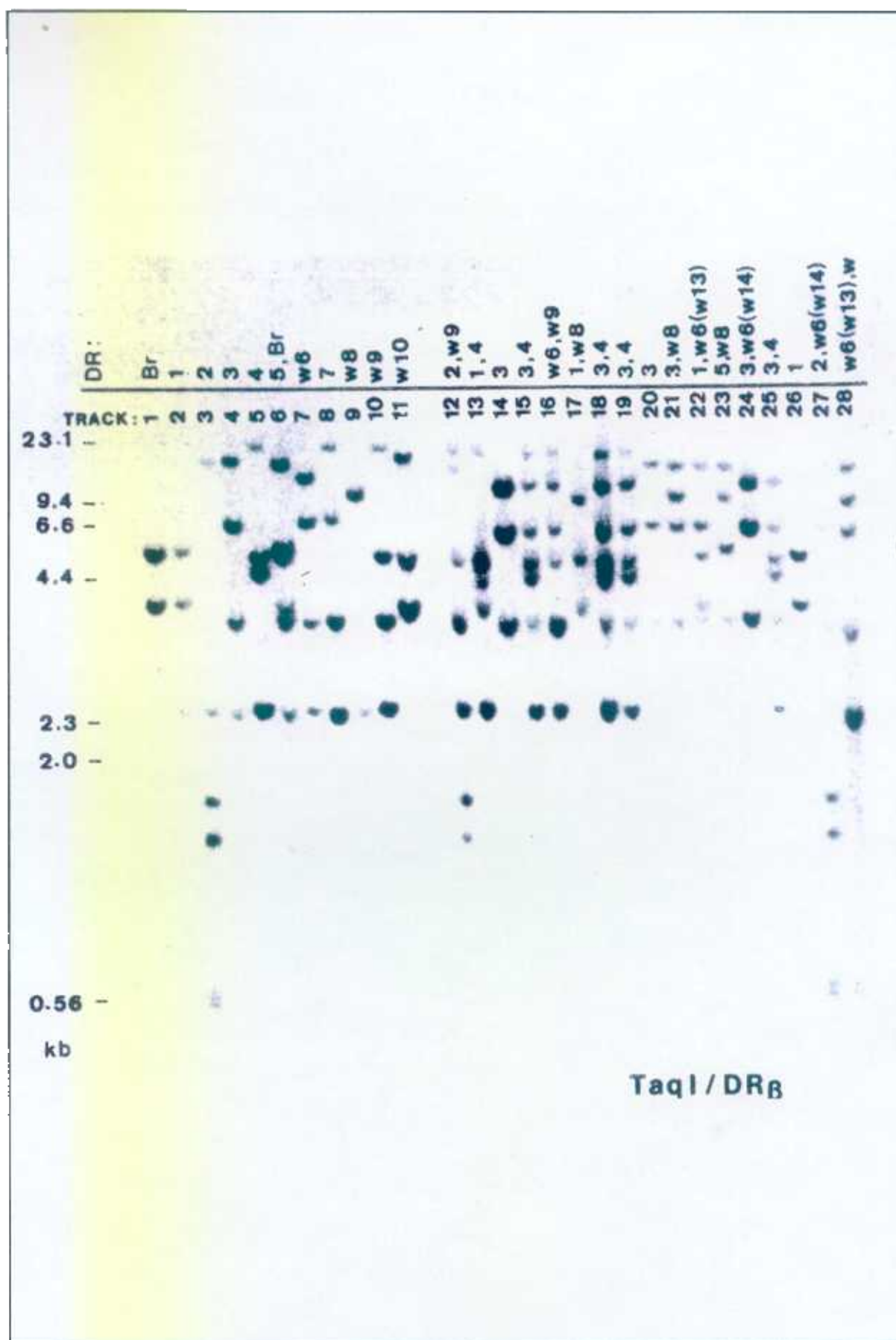


FIGURA 14. Patrones de restricción (RFLPs) en las diferentes células homocigotas de tipaje.

una aproximación, aunque grosera, a la secuenciación de DNA.

Con la aplicación de estas técnicas al sistema HLA y más en concreto a los genes de clase II (Bidwell y Jarrold, 1986; Bidwell y col., 1987; Bidwell, 1988), la tipificación de los antígenos HLA-DR es más fiable que con las técnicas serológicas, pero lo que aún es más importante, se definen nuevos alelos, que por serología

pasaban inadvertidos (así, por ejemplo el alelo DR13 serológico se subdivide en al menos 4 subtipos genéticos: 13a¹, 13a³, 13a⁴ y 13b). Para conseguir estos patrones "sencillos" fue necesario dejar de utilizar sondas de cDNA completas y utilizar sondas cortas como pRTV1 (Bidwell y Jarrold, 1986).

Los patrones característicos que se pueden obtener en células homocigotas de tipaje se sumarian en la figura 14. Un dato muy llamativo de esta técnica, aparte de la claridad de interpretación de resultados, es el diferente número de bandas que se obtienen en las diferentes células. Así, por ejemplo, en las células DR8 sólo se obtiene una banda, 2 bandas en las células DR1 y DR10, 3 bandas en las células DR2, DR3, DR5 y DR6 y 4 bandas en las células DR4, DR7 y DR9. Según se ha ido conociendo el sistema HLA, se ha podido comprobar que este número de bandas coincide con el número de genes HLA-DRB existentes en cada cromosoma si se exceptúa DR1, DR2 y DR10, que presentan una banda más que el número de genes que se conoce.

3.3 Polimorfismo genético de secuencia de DNA

Con la descripción y desarrollo de la determinada tecnología PCR (Saiki y col., 1985), el estudio del

sistema HLA se ha revolucionado en el sentido de que es relativamente sencillo obtener un elevado número de copias de un gen determinado y utilizar posteriormente estas copias en técnicas de tipaje con oligosondas o mediante secuenciación de DNA. Esto ha permitido que en los últimos años se hayan secuenciado muchos alelos de los diferentes loci HLA. En concreto, en la región HLA-DR se han obtenido hasta la fecha (Marsh y Bodmer, 1991) más de 50 secuencias diferentes para los diferentes loci HLA-DRB: 47 del gen DRB1, 4 del gen DRB3, 1 del gen DRB4 y 4 del gen DRB5. En la figura 15 se muestra la traducción a proteínas del exón 2 de todos estos alelos. En el exon 2 (que codifica para el dominio NH2 terminal) de los genes DRB se han localizado 3 regiones "hipervariables" concretas, apoyando la idea de conversión génica (Wu y col., 1986) como potenciadores del polimorfismo HLA: 1° nucleótidos -4 al 29 (residuos aminoácidos 4 al 14); 2° nucleótidos 63 a 79 (residuos 26 al 37); y 3° nucleótidos 186-209 (residuos 67 al 74) (Korman y col., 1985; Bell y col., 1987; Bidwell y col., 1989), como se representa en la figura 15.

3.4 Polimorfismo de "dosis" génica:

Hemos venido apuntando en apartados anteriores, que además del polimorfismo de alelos dentro de los diferentes loci HLA, en dos regiones concretas (C4 y HLA-DR) se ha detectado un polimorfismo de "dosis" génica, es decir, de variabilidad en el número de genes de un cromosoma a otro.

3.4.1 El caso de los genes de C4:

Cuando en 1978 se describió la existencia de 2 loci genéticos para la proteína de

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
DRB1*0101	GDTRPRFLWQ	LKFECHFFNG	TERVRLERC	LYNQEESVRF	DSDVGEYRAV	TELGRPDAEY	WNSQKDLLEQ	RRAAVDTYCR	HNYGVGESFT
DRB1*0102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---AV---
DRB1*0103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	I-D-E	-----	-----
DRB1*1501	-----	P-R	-----	F-D-Y F	-----	F	I-A	-----	---V---
DRB1*1502	-----	P-R	-----	F-D-Y F	-----	F	I-A	-----	-----
DRB1*1601	-----	P-R	-----	F-D-Y F	-----	-----	F-D	-----	-----
DRB1*1602	-----	P-R	-----	F-D-Y F	-----	-----	D	-----	-----
DRB1*0301	-----	EY STS	-----	Y-D-Y FH	N	F	K-GR-N	-----	---V---
DRB1*0302	-----	EY STS	-----	F-Y FH	N	-----	K-GR-N	-----	-----
DRB1*0401	-----	E-V-E	-----	F-D-Y F-H	Y	-----	K	-----	-----
DRB1*0402	-----	E-V-E	-----	F-D-Y F-H	Y	-----	I-D-E	-----	---V---
DRB1*0403	-----	E-V-E	-----	F-D-Y F-H	Y	-----	E	-----	---V---
DRB1*0404	-----	E-V-E	-----	F-D-Y F-H	Y	-----	-----	-----	---V---
DRB1*0405	-----	E-V-E	-----	F-D-Y F-H	Y	S	-----	-----	-----
DRB1*0406	-----	E-V-E	-----	F-D-Y F-H	Y	-----	E	-----	-----
DRB1*0407	-----	E-V-E	-----	F-D-Y F-H	Y	-----	E	-----	-----
DRB1*0408	-----	E-V-E	-----	F-D-Y F-H	Y	-----	-----	-----	-----
DRB1*1101	-----	EY STS	-----	F-D-Y F	Y	F	E	F-D	-----
DRB1*1102	-----	EY STS	-----	F-D-Y F	Y	F	E	I-D-E	---V---
DRB1*1103	-----	EY STS	-----	F-D-Y F	Y	F	E	F-D-E	---V---
DRB1*1104	-----	EY STS	-----	F-D-Y F	Y	F	E	F-D	---V---
DRB1*1201	-----	EY STG-Y	-----	H FH	LI	F	V-S	I-D	---AV---
DRB1*1202	-----	EY STG-Y	-----	H FH	LI	F	V-S	I-D	---AV---
DRB1*1301	-----	EY STS	-----	F-D-Y FH	N	F	-----	I-D-E	---V---
DRB1*1302	-----	EY STS	-----	F-D-Y FH	N	F	-----	I-D-E	-----
DRB1*1401	-----	EY STS	-----	F-Y FH	N	-----	-----	-----	-----
DRB1*1402	-----	EY STS	-----	F-D-Y FH	F	-----	A-E	R-E	---V---
DRB1*0701	Q	G-YK	QF	L F	F	-----	V-S	I-D	Q-Q V
DRB1*0702	Q	G-YK	QF	L F	F	-----	V-S	I-D	Q-Q V
DRB1*0801	-----	EY STG-Y	-----	F-D-Y F	Y	S	F-D	L	-----
DRB1*0802	-----	EY STG-Y	-----	F-D-Y F	Y	-----	F-D	L	-----
DRB1*0803	-----	EY STG-Y	-----	F-D-Y F	Y	S	I-D	L	-----
DRB1*0901	Q	K D	Y-H-G	N	-----	V-S	F-R	E V	-----
DRB1*1001	EE V	-----	R VH	YA-Y	-----	-----	R	-----	-----
DRB2*0201	EQ A-S	-----	Y	Y F	Y	N-M-F	I	K-E-N	-----
DRB3*0101	-----	EL R-S	-----	Y-D-Y FH	FL	-----	V-S	K-GR-N	-----
DRB3*0201	-----	EL S	-----	F-H FH	YA	-----	R	K-QQ-N	---V---
DRB3*0202	-----	EL S	-----	F-H FH	YA	-----	R	K-QQ-N	-----
DRB3*0301	-----	EL S	-----	F-Y FH	F	-----	V-S	K-QQ-N	---V---
DRB4*0101	Q	E A-C	L	WN-I-Y	YA-Y N-L	Q	-----	R-E	Y---V---
DRB5*0101	-----	Q D-Y	-----	F-H-D	DL	-----	F-D	-----	-----
DRB5*0102	-----	Q D-Y	-----	F-H-G	N	-----	F-D	-----	-----
DRB5*0201	-----	C-Q D-Y	-----	F-H-G	N	-----	I-A	-----	---AV---
DRB5*0202	-----	C-Q D-Y	-----	F-H-G	N	-----	I-A	-----	---AV---
DRB6*0101	-----	E A-C	I	MK-QY-N-Y	HKR-NLP	E-FQ	V-N	GI-E N-DK	F
DRB6*0201	-----	E A-C	I	MK-QY-N-Y	HKR-NL	N-E-FQ	V-N	GI-P-E K-DKM-D	F

FIGURA 15. Secuencias del dominio $\beta 1$ de las diferentes proteínas HLA-DR conocidas. Las regiones hipervariables 1^a, 2^a y 3^a están sombreadas en verde, amarillo y rosa, respectivamente.

C4 (O'Neill y col., 1978) se observó que era bastante frecuente la ausencia, al menos en caucasoides, del locus C4A ó C4B en algunos cromosomas, si bien no se detectó la ausencia de los 2 loci simultáneamente. Posteriormente se observó que estas ausencias eran en su mayoría debidas a la delección o pérdida de 28 kb de DNA en la región de C4, y que estas delecciones no sólo afectaban a uno de los genes de C4 sino, también, al gen de la CYP21 correspondiente (A ó B) (Carroll y col., 1985b). Paralelamente, se detectaron otros haplotipos (cromosomas) donde había 3 dosis de

genes de C4 en lugar de las 2 habituales (Raum y col., 1984). En la figura 16 se muestra un modelo de recombinación desigual que podría explicar la existencia de haplotipos con delección y duplicación. Como las recombinaciones ocurren, habitualmente, en los lugares de unión entre segmentos homólogos y no-homólogos, es probable que el intrón de 6.5 kb ausente en los C4B-"short" pueda tener un papel en estos mecanismos de recombinaciones desiguales.

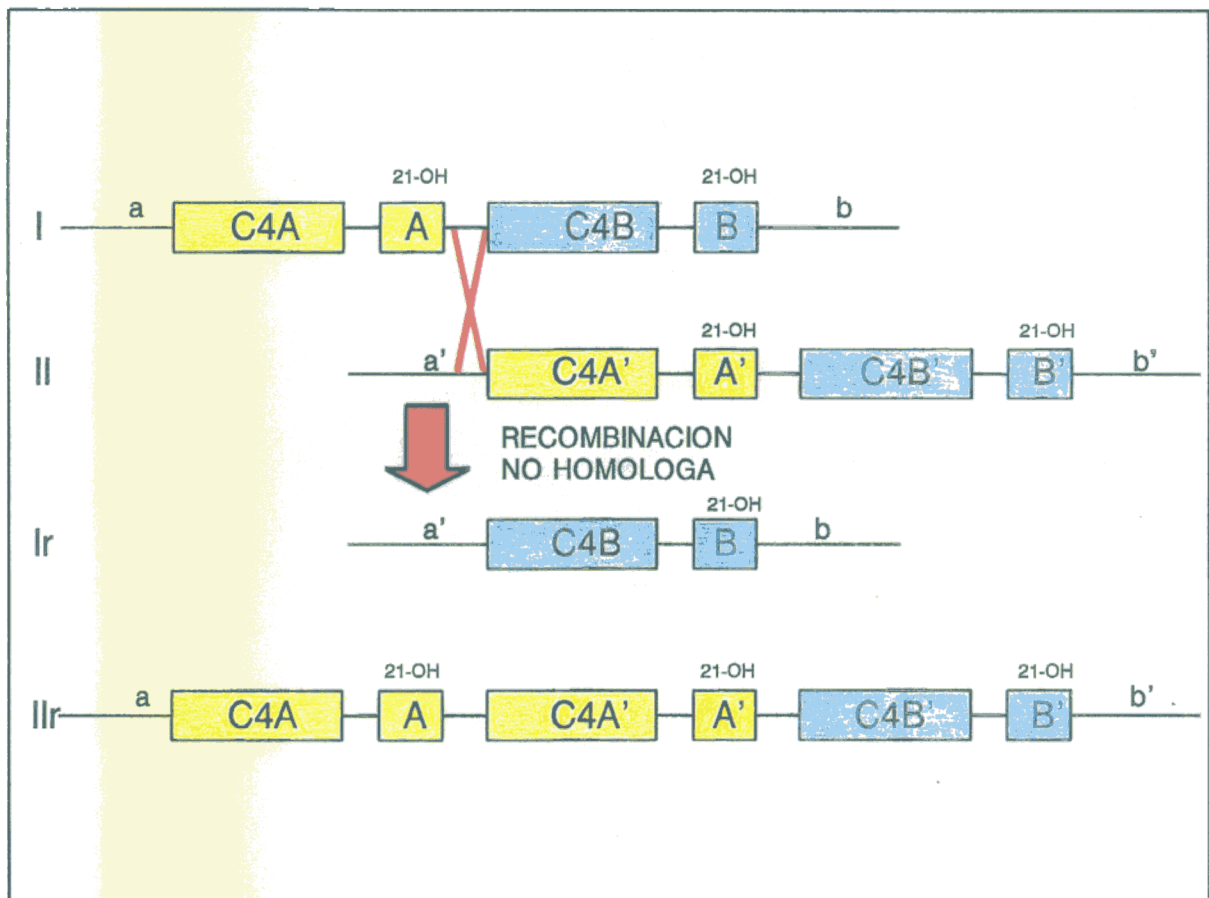


FIGURA 16. Mecanismo de recombinación no homóloga que origina cromosomas con 1 y 3 genes de C4.

3.4.2 El caso de la región HLA-DR

En la región HLA-DR se observa todavía una mayor variabilidad en el número de loci DRB que la observada en el caso de C4. Así, los cromosomas donde el locus

DRB1 codifica para los antígenos DR3, DR5 ó DR6, tienen una estructura muy similar, con dos genes DRB activos (DRB1 y DRB3, que codifica para la proteína DR52) y un pseudogen DRB (denominado actualmente DRB2; Rollini y col.,

1985). Este pseudogen, DRB2, ha perdido el exón 2 completo. Este grupo de cromosomas se denomina "Grupo del DR52" .

De modo similar, los cromosomas cuyo gen DRB1 codifica para las proteínas DR4, DR7 ó DR9, poseen una estructura genética muy similar con 4 diferentes genes DRB: 2 activos (DRB1 y DRB4, que codifica para la proteína DR53) y dos pseudogenes (recientemente nombrados como DRB7 y DRB8; Bodmer y col., 1992). Este grupo de cromosomas, en conjunto, se denomina "Grupo del DR53". Uno de los pseudogenes de este grupo carece de exón 2 completo, pero el otro tiene una estructura genética aparentemente normal. Pero además, y muy próximo al gen DRA, se ha encontrado en estos cromosomas una región que podría corresponder con un exón 2 suelto (Meunier y col., 1986; Haas y col., 1987); este exón ha sido recientemente nombrado como DRB9 (Bodmer y col., 1992).

Los cromosomas cuyo gen DRB1 codifica para proteínas DR2 tienen una estructura similar a los del grupo del DR52, con 2 genes activos (DRB1 y DRB5, que codifica para la proteína denominada DR51) y un pseudogen (Kawai y col, 1989). Este pseudogen se ha catalogado como tal, porque aunque contiene exón 2, carece de promotor, lo que hace que esta denominación no sea definitiva.

Por otra parte, los cromosomas cuyo gen DRB1 codifica para proteínas DR1 ó DR10 parecen tener sólo un gen activo, pero se sabe por los datos de RFLPs que deberían tener 2 genes (Bohme y col., 1985). Este gen "perdido" podría ser un pseudogen, pero no se sabe con certeza.

Finalmente, los cromosomas cuyo gen DRB1 codifica para proteínas DR8 tienen la estructura genética más sencilla, con un único gen (DRB1). Este dato correlaciona,

nuevamente, con que se obtenga una única banda de restricción en los estudios de RFLPs. Pero en cambio, se sabe que, por serología, las células DR8 cross-reaccionan con los sueros del grupo del DR52. Esta aparente contradicción se puede comprender si se piensa que estos cromosomas proceden del grupo DR52 habiendo sufrido una delección que incluya el extremo 3' del primer locus (DRB1), el segundo locus completo (DRB2) y el extremo 5' del tercer locus (DRB3) (Gorski, 1989); de modo que su único locus es un híbrido DRB1-DRB3, lo que explica sus reacciones serológicas cruzadas con el grupo del DR52.

Un resumen esquemático de los diferentes tipos de haplotipos enumerados se representa en la figura 17.

3.5 Posibles orígenes del polimorfismo del sistema HLA

El elevado polimorfismo encontrado en los loci del MHC funcionales, sitúa a este sistema totalmente aparte de otros genes conocidos. Se podría pensar, por tanto, que hay unas fuerzas de selección natural "específicas" actuando sobre el MHC. Por supuesto, los loci del MHC sufren selección negativa (purificación de alelos mutantes no funcionales) como el resto de los genes, pero esto no sería suficiente (Klein y col., 1990). ¿Se produce en este sistema genético algún tipo de selección positiva, que de ventaja a los individuos heterocigotos para los diferentes loci? Hay bastantes controversias a este respecto: evidencias en contra de esta supuesta selección positiva (Trowsdale y col., 1989) y estudios estadísticos que se inclinan a favor (Hughes y Nei, 1988).

Por otra parte, algunos investigadores han postulado que la generación de polimorfismo dentro de

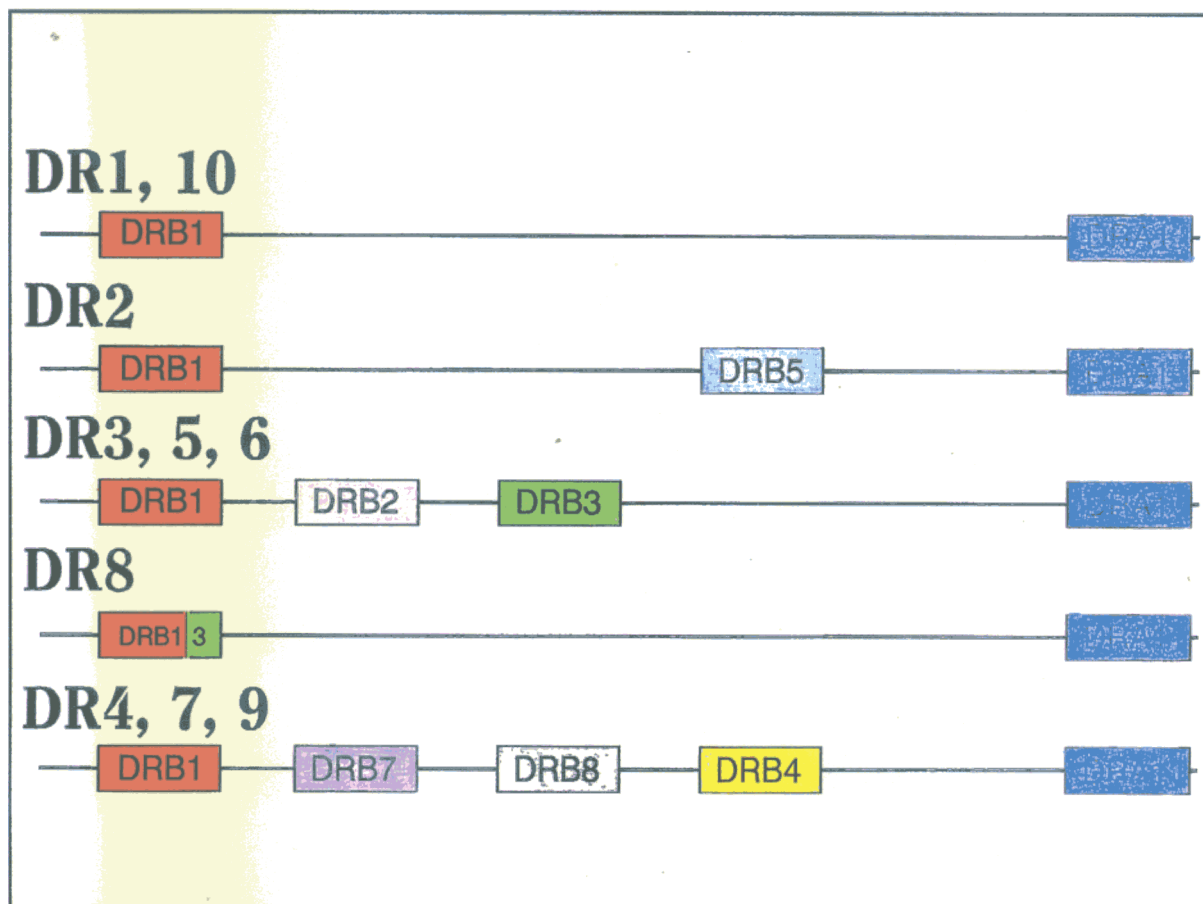


FIGURA 17. Dosis génica en los diferentes haplotipos HLA-DR.

estos genes es debida principalmente a fenómenos de "conversión génica" o recombinaciones no homólogas (Weiss y col. 1983). Sin embargo, estos mismos fenómenos podrían indicar justo lo contrario, es decir que se está manteniendo la estrecha homología que se ha demostrado que existe entre los distintos genes HLA tanto de clase I como de clase II.

En lo que si están de acuerdo los diferentes investigadores, es que tal cantidad de polimorfismo como se

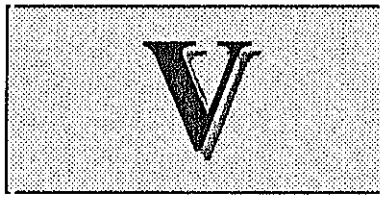
observa en algunos loci, no puede haber aparecido después de la especiación humana. Esto es, algunos alelos del sistema son más antiguos de lo que lo es la propia especie. Y a esta teoría de evolución, generación y mantenimiento del polimorfismo a través de las barreras entre especies se la ha denominado Evolución Trans-Especie (Klein., 1987).

IV

Objetivos

Basándonos, como se ha comentado en la introducción, en dos datos experimentales conocidos, esto es: la presencia de RFLPs adicionales en haplotipos con menor número de genes conocidos (DR1, DR2 y DR10) y la existencia de "variantes" de HLA-DR definidas por RFLPs pero con secuencia desconocida (DR13b), los objetivos fundamentales del presente trabajo fueron:

- 1 Identificar la secuencia de nucleótidos de variantes de HLA-DR definidas por serología y/o RFLP, y en concreto la del alelo HLA-DR13b.
- 2 Caracterizar la presencia y obtener la secuencia de los genes o pseudogenes HLA-DRB desconocidos que se detectaban por RFLPs en los cromosomas DR1, DR2 y DR10.
- 3 Una vez caracterizados dichos genes, estudiar su polimorfismo (si existe) y su distribución en los diferentes cromosomas HLA-DR.
- 4 Determinar si estos loci DRB hallados son genes o pseudogenes.
- 5 Completar el mapa genético de la región HLA-DR en los diferentes cromosomas HLA y estudiar los posibles mecanismos evolutivos que han dado lugar a las diferencias en número de genes observadas.



Materiales, Pacientes y Métodos

1. Preparación de las disoluciones empleadas

ACRILAMIDA 40%

Para 100 ml de preparación, pesar:
-38 g de acrilamida
-2 g de bis-acrilamida

disolver por agitación magnética a temperatura ambiente en unos 90 ml de agua bi-distilada. Añadir 10 g de resina de intercambio iónico y dejarla actuar durante 30 minutos. Filtrar por 0.2 μ m y enrasar a 100 ml con agua bi-distilada.

AMPICILINA (20 mg/ml)

-Disolver 500 mg de Ampicilina en 25 ml de Etanol al 80%
-La dosis para cultivos líquidos será (concentración final: 50 μ g/ml):
 *1.25 μ l para 5 ml de LB
 *1.5 ml para 600 ml de LB
 *3.5 ml para 1.4 litros de M9
-Para cultivos en placa: 100 μ l por placa

dA MIX (Taq)

-125 μ M dATP
-500 μ M dCTP
-750 μ M d-c³GTP
-500 μ M dTTP

dC MIX (Taq)

-500 μ M dATP
-125 μ M dCTP
-750 μ M d-c³GTP
-500 μ M dTTP

dG MIX (Taq)

-500 μ M dATP
-500 μ M dCTP
-188 μ M d-c³GTP
-500 μ M dTTP

dT MIX (Taq)

-500 μ M dATP
-500 μ M dCTP
-750 μ M d-c³GTP
-125 μ M dTTP

dNTP MIX (Sequenasa)

-2 mM dATP
-2 mM dCTP
-3 mM d-c³GTP
-2 mM dTTP

BPB 5x

-Tris, pH 7.6, 50 mM
-EDTA 50 mM
-SDS 0.5%
-BPB (azul de bromofenol) 0.1%
-Sacarosa 40 %

FORMAMIDA DESIONIZADA

El día de uso, pesar 5 g de resina AG 501-X8 (Biorad, cat. ref. 1426425) por cada 100 ml de formamida. Agitar con imán durante 30 minutos. Eliminar la resina filtrando por papel filtro normal.

"MAGICO" DENHART 50x (100%)

Para 200 ml:

1. Preparar 100 ml de BSA al 2% del siguiente modo:
-2 g de BSA en 80 ml de agua bi-distilada
-ajustar el pH a 3.0 con HCl 2N
-hervir durante 15 minutos
-poner en hielo 10 minutos
-ajustar sobre el el hielo, el pH a 7.5 con NaOH
-enrasar con agua hasta 100 ml

2. Preparar 100 ml de PVP 40 al 2% /Ficoll (400) al 2%. Autoclavar 30 minutos a 100°C.

3. Mezclar los 100 ml de cada una de las soluciones anteriores. Fraccionar y conservar congelado a -20°C hasta su uso.

MEDIO RICO LB

-Pesar en un erlenmeyer:

-6 g de Bacto-triptona
-3 g de Bacto-Yeast Extract
-6 g de NaCl

-Disolver con agua destilada y ajustar el pH a 7.5 con NaOH 2N.

-Ajustar el volumen final a 600 ml

-Autoclavar

MEDIO MINIMO M9

-Pesar en un erlenmeyer:

-8.4 g de Na₂HPO₄
-4.2 g de KH₂PO₄
-0.7 g de NaCl
-1.4 g de NH₄Cl
-7.0 g de Casaminoácidos

-Disolver en agua bi-distilada y ajustar el pH a 7.3 con NaOH 2N.

-Enrasar a 1.4 litros

-Autoclavar

-Añadir, filtrando a través de un filtro Millex-0.22, la siguiente mezcla:

- 2.8 ml de $MgSO_4$ 1 M
- 0.14 ml de $CaCl_2$ 1 M
- 9.33 ml de Glucosa al 30%

- Eliminar por aspiración la fase acuosa superior
- Añadir a la fase orgánica (inferior) restante 333 ml de Tris, pH 8.0, 0.1 M / Mercaptoetanol 0.2 % y mezclar vigorosamente.
- Centrifugar la mezcla durante 10 minutos a 1.500 rpm
- Eliminar la fase acuosa superior. La fase orgánica inferior (que denominaremos de aquí en adelante PCI) está lista para su uso y se debe conservar a 4°C y en oscuridad.

MEDIO LIQUIDO TY 2x

Para preparar 1 litro, pesar:

- 16 g de Bacto-tryptona
- 5 g de Bacto-Yeast extract
- 5 g de NaCl

ajustar el pH a 7.2-7.4 con NaOH 2 N

PLACAS H

- *Disolver 10 g de Bacto-triptona y 8 g de NaCl en 1 litro de agua desionizada.
- *Añadir 12 g de Bacto-agar
- *Autoclavar
- *Dejar enfriar a 56°C y poner 25 ml por placa petri

OLB 5x (Oligomer labelling buffer 5x)

-Solución "0"

- Tris, pH 8.0, 1.25 M
- $MgCl_2$ 0.125 M
- Conservar a 4°C

-Solución "A"

- 1 ml de solución "0"
- 18 µl de beta-2-mercaptoetanol 3M
- 5 µl dATP*
- 5 µl dGTP*
- 5 µl dTTP*
- * Cada nucleótido trifosfato previamente disuelto a 0.1 M en Tris, pH 7.0, 3mM / EDTA 0.2mM
- Conservar a -20°C

-Solución "B"

- Hepes 2 mM llevado a pH 6.6 con NaOH 4M
- Conservar a 4°C

-Solución "C"

- Hexadeoxinucleótidos (Pharmacia cat. no. 2166) resuspendidos en Tris, pH 7.0, 3MM / EDTA 0.2 mM a una concentración de 90 unidades ópticas (OD) por mililitro.
- Conservar a -20°C

-Preparación del OLB 5x:

- Mezclar las soluciones A : B : C en las proporciones:
100 : 250 : 150

RCLB (Red Cell Lysis Buffer)

- Tris, pH 7.6, 0.01 M
- $MgCl_2$ 0.005 M
- NaCl 0.001 M

RNA: TAMPON DE LISIS

- NaCl 0.14 M
- $MgCl_2$ 1.5 M
- Tris, pH 8.6, 10 mM
- Nonidet P-40 0.5%

SOLUCION 1 (Lisis alcalina)

- Tris, pH 8.0, 25 mM
- EDTA 10 mM
- Glucosa 50 mM

SOLUCION 2 (Lisis alcalina)

- NaOH 0.2 N
- SDS 1 %

(Usar muy reciente. Preparar semanalmente)

SOLUCION 3 (Lisis alcalina)

- Preparar Acetato potásico 5 M
- A 360 ml del preparado añadirle 70 ml de Acido acético glacial y ajustar el pH a 4.8
- Añadirle agua hasta 500 ml. Se obtiene así una disolución 5 M para acetato y 3 M para potasio.

PCI (Phenol / Cloroformo / Isoamílico)

- Calentar fenol hasta su fusión completa en una estufa a 80°C durante toda una noche.
- Mezclar 3 volúmenes de fenol (750 ml) con 1 volumen (250 ml) de cloroformo / isoamílico (24/1)
- Añadir 333 ml de Tris, pH 8.0, 1 M y mezclar vigorosamente
- Centrifugar la mezcla durante 10 minutos a 1.500 rpm

SOLUCIONES DE PREHIBRIDACION E HIBRIDACION

Prehibridacion

- Formamida desionizada 50%
- Magic Denhart 0.1%

-SSPE	5x	-EDTA 2 mM
-SDS	1%	-"Mágico" Denhart 5x
-Sulfato de dextrano	5%	-SDS 0.1 %
-ssDNA	200µg/ml	-ssDNA 100 µg/ml

Hibridación

Es exactamente igual a la solución anterior, pero conteniendo la sonda previamente marcada radiactivamente.

SOLUCION PEG

- Polietilenglicol (8000) al 20%
- NaCl 2.5 M

Preparar semanalmente mezclando volúmenes iguales de PEG 40% y NaCl 5 M y filtrando por 0.2 µm.

SOLUCION TMAC

- Tris, pH 8.0, 50 mM
- Cloruro de Tetrametil amonio (TMAC) 3 M
- EDTA 2 mM
- SDS 0.1 %

ssDNA 10 mg/ml

- Pesar 500 mg de DNA de esperma de salmón
- Añadir agua bi-distilada hasta 40 ml
- Soncar durante 30-60 minutos
- Hervir durante 10 minutos
- Poner en hielo durante 10 minutos
- Enrasar a 50 ml
- Fraccionar y conservar a -20°C

SSPE 5x

- NaCl 4.5 M
- NaH₂PO₄ 0.3 M
- EDTA 30 mM

- *Ajustar el pH a 7.7 con NaOH
- *Disolver toda la noche en agitación a temperatura ambiente

SULFATO DE DEXTRANO AL 50 %

- Pesar 250 g de sulfato de dextrano sobre una probeta de plástico de 500 ml
- Ir añadiendo agua y agitando sucesivamente, hasta que se disuelva la mayor parte del granulado.
- Dejar agitando toda la noche a 4°C
- Fraccionar y conservar a -20°C

TAMPON FOSFATO (Tampón de transferencia)

- NaH₂PO₄ 25 mM
- Na₂HPO₄ 25 mM

TMAC PARA HIBRIDACION

- Tris, pH 8.0, 50 mM
- TMAC 3 M

TAMPON KINASA 10x

- Tris, pH 7.6, 0.5 M
- MgCl₂ 0.1 M
- Ditiotreitol 50 mM
- Espemidina 1 mM
- EDTA 1 mM

TAMPON PK 2x

- Tris, pH 7.5, 0.2 M
- EDTA 25 mM
- NaCl 0.3 M
- SDS 2 %

TAMPON LIGASA 5x

- Tris, pH 7.6, 0.33 M
- MgCl₂ 25 mM
- Ditiotreitol 25 mM
- Seroalbúmina bovina 0.5 mg/ml
- Cloruro de hexamino-cobalto 5 mM
- ATP 1 mM
- Espemidina-HCl 2.5 mM

TAMPON SEQUENASA 5X

- Tris, pH 7.5, 50 mM
- MgCl₂ 50 mM
- NaCl 250 mM

TAMPON Sma-I 10x

- Tris-acetato, pH 7.9, 333 mM
- Mg-acetato 100 mM
- K-acetato 666 mM
- Ditiotreitol (DTT) 5 mM

TAMPON Taq polimerasa 5x

- Tris, pH 8.5, 50 mM
- MgCl₂ 50 mM
- NaCl 250 mM

TAMPON Taq de dilución

- KCl 500 mM
- Tris, pH 8.3, 100 mM
- MgCl₂ 15 mM
- gelatina 0.1%

TBE 10x

Por cada litro de tampón, pesar:

- 100 g de Tris
- 55 g de Ácido Bórico

-8.3 g de EDTA

el pH debe estar entre 8.2 y 8.4

TEA 50x

-Tris 2 M

-Ácido acético glacial 1 M

-EDTA 0.1 M

*Ajustar el pH a 8.0 con ácido acético y filtrar por 0.22

TE 1x

-Tris, pH 8.0, 2 M

-EDTA 1 mM

TE 10/1

-Tris, pH 8.0, 10 mM

-EDTA, pH 8.0, 1 mM

TETRACICLINA (2 mg/ml)

1. Disolver 200 mg de Tetraciclina en 100 ml de Etanol al 80%

2. La dosis para cultivos líquidos será (concentración final: 10 µg/ml):

-25 µl para 5 ml de LB

-3 ml para 600 ml de LB

-7 ml para 1.4 litros de M9

3. Para cultivos en placa: 200 µl por placa

TOP AGAR

Se prepara exactamente igual que las PLACAS H, pero poniendo 8 g de Bacto-Agar por cada litro de medio en lugar de 12 g.

WCLB (White Cell Lysis Buffer)

-Tris, pH 7.6, 10 mM

-EDTA, pH 8.0, 10 mM

-NaCl 50 mM

-SDS 0.2 %

-Proteínasa K 200 µg/ml

2. Determinación del fenotipo HLA

Los antígenos HLA se determinaron sobre linfocitos aislados de sangre periférica desfibrinada. La sangre se extrajo al vacío (Sistema Venoject, Terumo, Tokio) en tubos de vidrio de 10 ml provistos de 40-50 perlas de poliestireno de 1 mm. de diámetro. La desfibrinación se realizó mediante agitación (10 minutos) de los tubos, lo que induce la formación del coágulo de fibrina alrededor de las perlas. La sangre se decantó, se diluyó 1/2 en medio Hanks (Flow, Reino Unido). 6 ml de sangre diluida se añadieron cuidadosamente sobre 4 ml. de Lymphoprep ($d=1.077$ g/ml, Nyegaard, Noruega) procurando que no se mezclaran las fases, y se centrifugaron a 1.800 rpm. durante 40 minutos. Los linfocitos se recogieron de la interfase con una pipeta Pasteur, y después de lavarlos tres veces con medio Hanks (10 ml, 10 minutos, 1.200 rpm), se resuspendieron en medio apropiado y a la concentración adecuada. El rendimiento es de 1×10^6 linfocitos /ml de sangre periférica. El recuento de linfocitos se realizó en una cámara de Neubauer mediante un microscopio con contraste de fase (Nikon, Japón).

Todos los medios utilizados para el aislamiento de linfocitos contenían antibióticos (Gentamicina 40 μ g/ml, Ampicilina 125 μ g/ml, Cloxacilina 125 μ g/ml) y se ajustaron a pH 7.3 con NaHCO₃ al 7.5% (Flow, Reino Unido).

2.1 HLA-A, -B, -C, Bw4/Bw6:

La determinación de estos antígenos se llevó a cabo por microlinfocitotoxicidad sobre linfocitos totales (Mittal y col., 1968), utilizando una batería de antisueros que cubría la mayor parte de las especificidades listadas en la Tabla 1. El ensayo se basa en la especificidad de los antisueros empleadas, que reconocen y se fijan a los antígenos HLA sobre los linfocitos que presentan, provocando su lisis al añadir complemento (reacción positiva). Esta reacción no tiene lugar cuando los linfocitos en estudio no presentan los antígenos HLA que reconocen los antisueros (reacción negativa).

Los antisueros, incluyendo un control positivo (suero antilinfocítico OTWH 02/03, Behring, Alemania) y un control negativo (suero humano AB Rh+), se dispusieron en placas especiales para tipajes (tipo Terasaki, Sterilin, Reino Unido) provistas de 60 pocillos de 15 μ l de volumen (1 μ l de antisuero por pocillo), se recubrieron de parafina líquida (Merck, Alemania) para evitar la evaporación y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

Los linfocitos totales obtenidos como se indica anteriormente, se resuspendieron en medio Hanks a una concentración de 2.5×10^6 células/ml. Con una microjeringa (Hamilton, Nevada) provista de dispensador automático se añadió 1 μ l de la suspensión de linfocitos a cada uno de los pocillos de la placa de Terasaki. Estas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, añadiéndose después 5 μ l por pocillo de complemento de conejo (Behring, Alemania) e incubándose 60 minutos más. Las reacciones positivas y negativas se determinaron inmediatamente después en cada pocillo mediante un microscopio invertido con contraste de fase (Nikon, Japón). En la Figura 18 se representa un esquema sencillo de la técnica completa. El fenotipo HLA-A, -B, -C, -Bw4, -Bw6 se dedujo de las especificidades de los antisueros con reacción positiva. La cuantificación de las reacciones se hizo de acuerdo con la siguiente nomenclatura utilizada internacionalmente: 8= más del 80% de linfocitos muertos; 6= 60-80% de linfocitos muertos; 4= 40-60% de linfocitos muertos; 2= 20-40% de linfocitos muertos; 1= menos del 20% de linfocitos muertos; 0= reacción no valorable. Se consideran positivos los pocillos con reacciones de 8 ó 6, dudosos con reacciones de 4 y negativos con reacciones de 2 ó 1.

2.2 HLA-DR, -DQ:

La determinación de los antígenos de clase II se llevó a cabo por microlinfocitotoxicidad sobre linfocitos B purificados (Danilovs y col., 1980), ya que estos antígenos están presentes en linfocitos B pero no en linfocitos T. Los linfocitos B constituyen un 10% de los linfocitos totales de sangre periférica. Para su aislamiento se prepararon microcolumnas de plástico (0.6 x 19.5 cm, Winkler, California) con 60 mg de lana de fibra de nylon (Fenwall, Illinois) suavemente empaquetada (15 mg/cm) y sumergida en medio RPMI 1640 (Flow, Reino Unido) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal descomplementado (Flow, Reino Unido). Las microcolumnas se sellaron a fuego en cuña por un extremo y se taparon con Nescofilm (Nesco, Japón) por el otro, conservándose a -80°C hasta su utilización.

Los linfocitos totales obtenidos como se indica más arriba, se resuspendieron a una concentración de 80×10^6 células/ml de medio RPMI 1640 más 10% de suero de ternera fetal ("medio Fetal") calentado a 37°C. La suspensión se introdujo por la parte superior de la microcolumna, que se había lavado e incubado previamente con medio Fetal 30 minutos a 37°C, se selló con Nescofilm por ambos extremos cuando hubo empapado la lana de nylon y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Los linfocitos T se eluyeron haciendo pasar 20 ml de medio Fetal a 37°C a través de la lana de nylon. Los linfocitos B se extrajeron comprimiendo de arriba a abajo la lana de nylon empapada en medio Fetal a 37°C y lavado repetidas veces con dicho medio hasta completar 10 ml. Los linfocitos B se lavaron dos veces (10 ml, 10 minutos, 1.200 rpm) con medio Fetal antes de su utilización. El rendimiento de la técnica fue del 10% de linfocitos B respecto a los linfocitos totales iniciales, y la pureza de la preparación del 90%. Los antisueros utilizados abarcaban las especificidades listadas en la tabla..... Los linfocitos B purificados se resuspendieron en medio Fetal a una concentración de 2.5×10^6 células/ml. Se añadió 1 μ l de esta suspensión a cada antisuero y se incubó la mezcla 50 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 μ l por pocillo de complemento de conejo y se incubó la mezcla 100 minutos más. Las placas se tñieron con eosina (Merck, Alemania) al 5% (5 μ l por pocillo) y se fijaron con 10 μ l por pocillo de formaldehído (Merck, Alemania) y se conservaron a 4°C hasta su lectura. Las reacciones positivas (linfocitos rojo oscuro) y negativas (linfocitos refringentes) se determinaron mediante un microscopio invertido con contraste de fase (Nikon, Japón). El tipaje HLA-DR y -DQ se dedujo de las especificidades de los antisueros con reacción positiva. Las reacciones se cuantificaron exactamente igual a lo explicado para clase I.

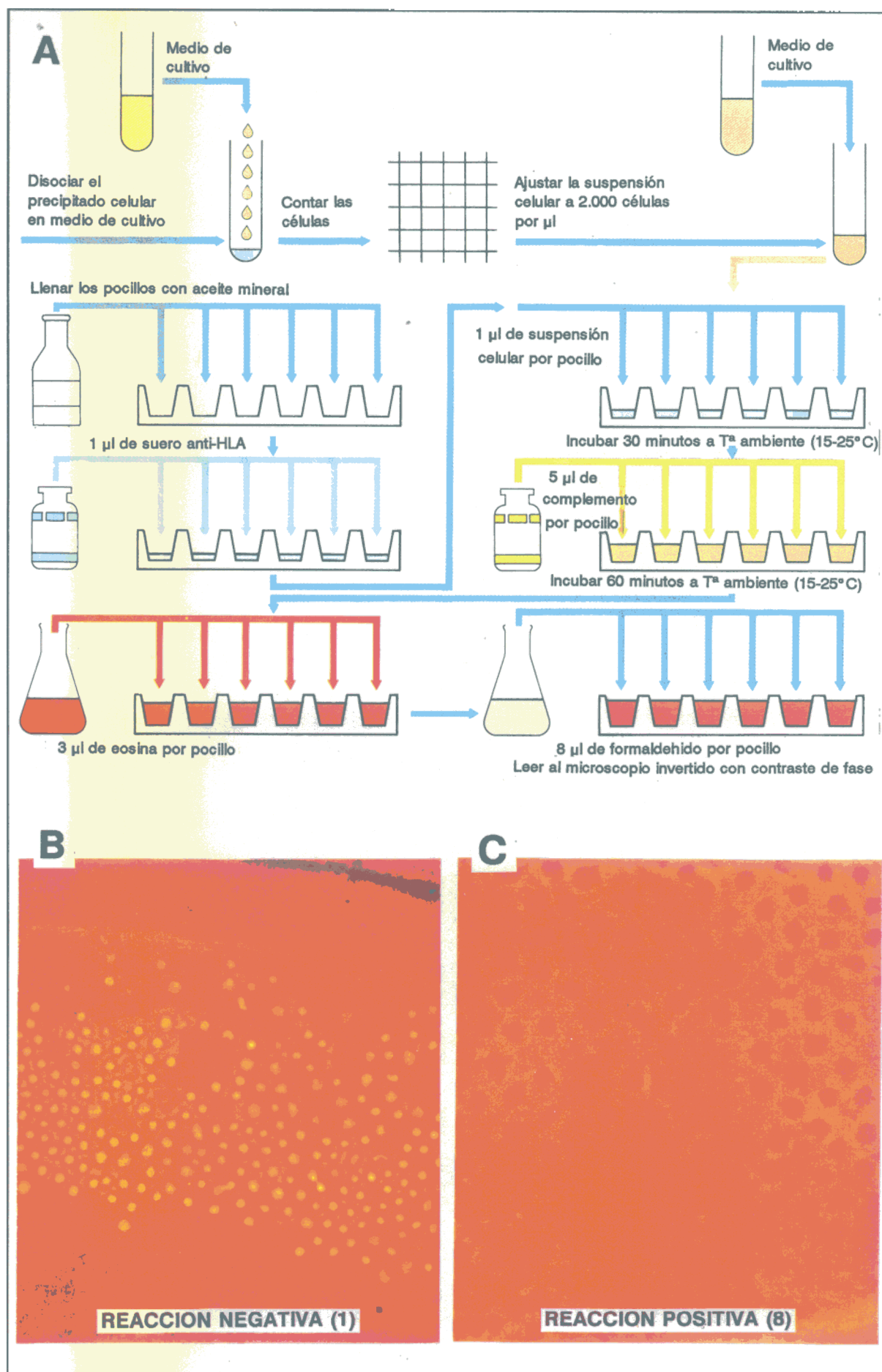


Figura 18. Test de microlinfocitotoxicidad para la determinación del fenotipo HLA de clase I.

3. Aislamiento del material genético

3.1 Estracción de DNA genómico

El DNA se extrajo a partir de sangre total en los mismos individuos que determinaba el fenotipo HLA o a partir de células Homocigotas de tipaje. La sangre (30 ml) se extrae al vacío en tubos con EDTA K₂ (Terumo, Japón). Después de centrifugar la muestra durante 5 minutos a 1.500 rpm, se remueve el sobrenadante y se añade tampón de lisis de eritrocitos (RCLB del inglés: Red Cell Lysis Buffer) hasta un volumen final de mezcla de 50 ml. Se mezcla cuidadosamente y se procede a una segunda centrifugación durante 10 minutos a 1.500 rpm, desechando, al final de la misma el sobrenadante. Se repite el proceso anterior una segunda vez, al final de la cual, se procede a resuspender el precipitado en 0.5 ml de RCLB.

Los 500 µl anteriores, conteniendo las células blancas de sangre, o la suspensión de células homocigotas (si se parte de éstas últimas) se someten a un proceso de extracción automático (Davis y col., 1980) en un extractor de DNA 340A (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) que se esquematiza en la Figura 19, y que se resume en los siguientes pasos:

- Incubación a 50°C y durante 1 hora con solución de lisis de células blancas (WCLB del inglés: White Cell Lysis Buffer).
- Dos extracciones consecutivas con PCI.
- Una extracción con Cloroformo / Isoamílico (24/1).
- Adición de acetato sódico 3 M.
- Adición de un volumen de alcohol isopropílico.
- Agitación suave (precipitación del DNA en forma de una "medusa")
- Tres lavados sucesivos del DNA con etanol al 70%.
- Recogida y secado de la muestra de DNA sobre un filtro.

Los DNAs así extraídos se obtienen sobre un filtro estéril. Se les añade agua bi-distilada para su resuspensión. Para ello se someten a una centrifugación lenta conectada a vacío y calor durante 20 minutos. Cuando este tratamiento es insuficiente para obtener una resuspensión completa, durante días sucesivos se someten a períodos alternativos de calentamiento a 37°C/ agitación rotatoria suave. Finalmente se realizan lecturas espectrofotométricas de absorción a 260 y 280 nm, para calcular su concentración y se conservan a -20°C hasta su utilización.

3.2 Extracción de RNA citoplásmico total

(Sambrook y col., 1989)

- Por cada 10 a 30 millones de células se obtiene un precipitado seco en un tubo tipo eppendorf de 1.5 ml.
- Se resuspende el precipitado en 250 µl de Tampón de lisis de RNA y 5 µl de Inhibidor de RNAsas a 50 Unidades/µl.
- Se incuba la muestra en hielo 1 minuto.
- Se centrifuga a 14.000 rpm durante 2 minutos y a 4°C.
- El precipitado grande corresponde a los núcleos celulares y se puede procesar para obtener DNA. El sobrenadante, transparente, se procesa para RNA como sigue:
- Añadir 250 µl de Tampón PK 2x.
- Añadir 20 µl de Proteinasa K (preparada a 10 mg/ml en Tris, pH 7.5, 20 mM).
- Incubar a 37°C durante 30 minutos.

- Añadir 1 volumen de PCI (500 µl)
- Agitar vigorosamente e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos y a 4°C.
- Pasar la fase acuosa (superior) a un tubo limpio)
- Repetir la extracción con PCI
- Añadir 50 µl de Acetato sódico, pH 5.5, 3 M.
- Añadir 1 ml de etanol absoluto.
- Agitar bien la mezcla.
- Incubar a -80°C durante 30 minutos o a -20°C toda la noche.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos y a 4°C.
- Aspirar el sobrenadante a vacío.
- Añadir 500 µl de Etanol al 70% (pre-enfriado a -20°C).
- Agitar suavemente para lavar el precipitado.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos y a 4°C.
- Aspirar el sobrenadante a vacío.
- Secar el precipitado totalmente.
- Resuspender el precipitado seco en 20 µl de agua bi-distilada.
- Añadir 180 µl de TE 1x a los 20 de la muestra.
- Añadir 2 µl de MgCl₂ 1M y 2 µl de DTT 10 mM (para que queden a concentraciones finales de 10 mM y 0.1 mM respectivamente).
- Añadir 4 µl de Inhibidor de RNAsas (a concentración de 50 unidades/µl)
- Añadir DNAsa-I de E. coli para que quede a concentración final de 2 µg/ml (8 µl a concentración de 200 unidades/µl).
- Incubar a 37°C durante 60 minutos
- Añadir 25 µl de EDTA 100 mM y 25 µl de SDS al 2%.
- Añadir 250 µl de PCI y agitar intermitentemente durante 5 minutos.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos y a temperatura ambiente.
- Pasar la fase acuosa superior a un tubo limpio.
- Añadir 25 µl de Acetato sódico, pH 5.2, 3 M y 500 µl de etanol absoluto.
- Incubar a -80°C durante 30 minutos.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos y a 4°C.
- Lavar con etanol al 70% pre-enfriado a -20°C.
- Secar totalmente el precipitado y resuspenderlo en 20 µl de agua bi-distilada.

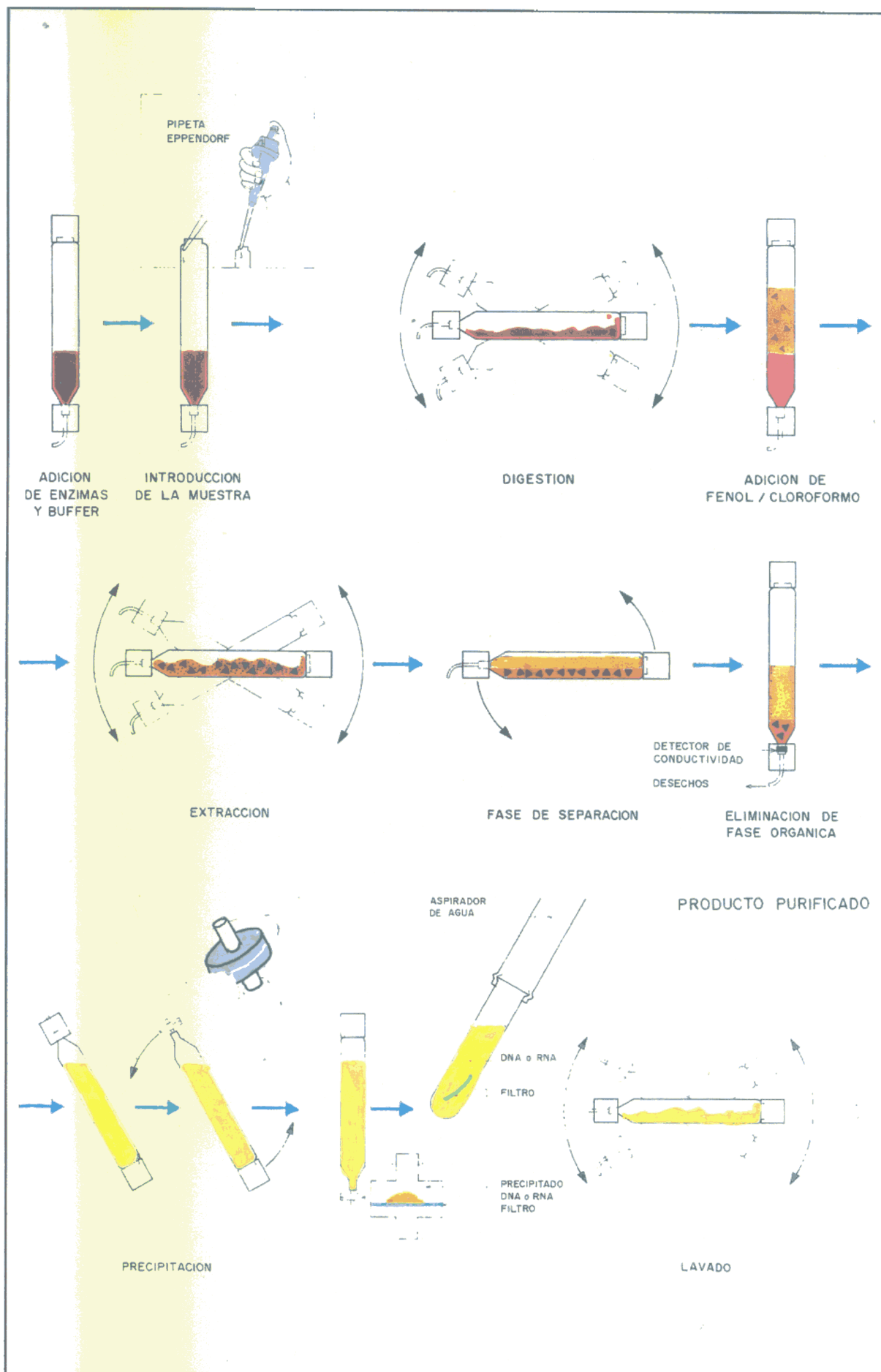


Figura 19. Esquema del proceso de extracción automático de DNA en el extractor 340A de Applied Biosystems.

4. Obtención de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLPs).

(Armaiz-Villena y col., 1989; Bidwell y Jarrold, 1986; Martínez-Laso y col., 1989; Sambrook y col., 1989)

4.1 Preparación y purificación de plásmidos y sondas

Día 1: Precultivo

- Preparar un erlenmeyer de 2 litros con 600 ml de medio rico LB estéril.
- Añadir el antibiótico adecuado (según la resistencia del plásmido que se vaya a cultivar).
- Añadir 2 vials del cultivo bacteriano que se va a amplificar (conservados a -20°C en glicerol al 15%)
- Agitar en un incubador orbital a 37°C y 150 rpm durante toda la noche.

Día 2: Cultivo

- Preparar un erlenmeyer de 5 litros con 1.4 litros de medio mínimo M9.
- Añadirle el antibiótico adecuado.
- Verter el cultivo obteniendo en los 600 ml de medio LB dentro del erlenmeyer que contiene el medio M9.
- Agitar en un incubador orbital a 37°C y 150 rpm durante toda la noche.

Día 3: Tratamiento con cloranfenicol

(Este tratamiento no es imprescindible, pero sí recomendable, sobre todo cuando se trabaja con plásmidos que generan pocos números de copias)

- Añadir cloranfenicol (solución madre: 34 mg/ml en etanol absoluto) en la proporción de 5 ml por cada litro de cultivo.
- Agitar en el incubador orbital a 37°C y 150 rpm durante toda la noche.

Día 4: Lisis bacteriana

- Centrifugar los cultivos en botellas de 1 litro de capacidad a 4.000 rpm durante 30 minutos.
- Decantar el sobrenadante y desecharlo.
- Resuspender el precipitado celular en 40 ml de Solución 1.
- Añadir 500 µl de Lisozima (preparada a 4 mg/ml en solución 1). Esta enzima, puede tenerse preparada previamente y conservada en alícuotas a -20°C.
- Agitar la botella, invirtiéndola, suavemente hasta que se observe un aumento grande de la viscosidad (aproximadamente 5 minutos).
- Añadir 80 ml de Solución 2.
- Agitar la botella suavemente, invirtiéndola, hasta que la mezcla sea prácticamente transparente (5 minutos).
- Añadir 80 ml de Solución 3.
- Agitar la botella suavemente, procurando que el precipitado floculento que se forma sea uniforme y lo menos disgregado posible (3-4 minutos).
- Centrifugar a 4.700 rpm durante 1 hora.
- Retirar el sobrenadante pasándolo a una botella limpia (colocando una gasa estéril para evitar que entren partículas del precipitado).

- Añadir a este sobrenadante 360 ml de Alcohol Isopropílico puro, agitar y dejar en hielo hasta la aparición de un precipitado (45 minutos)
- Centrifugar a 4.500 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante con cuidado de no mover el precipitado (aspirando a vacío, por ejemplo)
- Dejar secar el precipitado
- Resuspender en 15 ml de TE 1x.
- Pasar el plásmido resuspendido a botellas de policarbonato para ultracentrífuga.
- Centrifugar a 25.000 rpm durante 30 minutos y a 4°C.
- Recoger el sobrenadante.
- Añadir al sobrenadante 200 µl de RNasa libre de DNasa (preparada según Maniatis, 1991) e incubar a 37°C durante 1 hora.
- Añadir a la mezcla gránulos de Proteinasa K para que quede a una concentración final de 200 µg/ml.
- Incubar toda la noche a 42°C con agitación.

Día 5: Purificación y precipitación:

- Añadir el mismo volumen de PCI que el de muestra a purificar.
- Agitar vigorosamente la mezcla con la mano o un agitador orbital fuerte 3 a 5 minutos
- Centrifugar a 1.500 rpm durante 3 minutos. Si tras la centrifugación no se observa una separación nítida en 2 fases, aumentar el tiempo o velocidad de centrifugación.
- Transferir la fase acuosa superior a un tubo limpio, desechando la interfase blanquecina y la fase orgánica inferior.
- Repetir los pasos anteriores una vez más
- Añadir un volumen igual al de muestra de Cloroformo / Isoamílico (24/1).
- Agitar vigorosamente 3 a 5 minutos
- Dejar reposar la mezcla
- Eliminar la fase orgánica inferior que se forma
- Repetir otra vez todo el proceso con cloroformo.
- Añadir el volumen adecuado de NaCl 3M para que quede a una concentración final de 150 mM.
- Añadir 2 volúmenes de Etanol Absoluto o 1 volumen de Alcohol Isopropílico.
- Agitar e incubar 30 minutos a -80°C o toda la noche a -20°C.
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 45 minutos y a 4°C
- Decantar el sobrenadante y secar el precipitado a vacío.
- Resuspender el precipitado en 4 ml de agua bidestilada.

RECUPERACION DE LAS SONDAS A PARTIR DE LOS PLASMIDOS:

I: Digestión con endonucleasas:

- Una vez purificado el plásmido, para liberar la sonda que contiene, se estima su concentración y pureza por medida espectrofotométrica a 260 y 280 nm.
- La digestión se hace con las endonucleasas específicas con las que se haya clonado la sonda. Se trata el DNA con la enzima adecuada en una proporción de 5 Unidades Enzimáticas (U.E.) por cada µg de DNA. Esta mezcla, se incuba durante 3 horas (pudiéndose alargar la incubación a toda una noche) en presencia de un tampón específico para cada endonucleasa, a la temperatura específica de cada endonucleasa.
- Las sondas utilizadas, amablemente cedidas por Jeffrey Bidwell, UK Transplant Service, Bristol, Reino Unido

(Bidwell y col., 1988), fueron:

pRTV1: fragmento Pst-I de 517 bp de un clon de cDNA HLA-DRB (ver Figura 20).

pDCH1: fragmento Pst-I de 797 bp de un clon de cDNA HLA-DQA (ver Figura 20).

pII-B-1: fragmento Ava I de 627 bp de un clon de cDNA HLA-DQB (ver Figura 20).

II. Gel de agarosa preparativo:

- El resultado de la digestión se corre en un gel de agarosa al 1% con pocillos preparativos. A cada lado de la muestra se colocan marcadores de peso molecular para poder localizar el tamaño específico de la sonda liberada.
- Tras una electroforesis de 4-5 horas a 60 voltios se debe observar claramente la separación por tamaño del fragmento de sonda liberado y del plásmido vector.
- Se coloca el gel sobre un trasluminador ultravioleta y se corta con un bisturí, el fragmento de agarosa que contiene la sonda.

III. Electroelución:

- Se introduce el fragmento de agarosa en una membrana de diálisis y se sumerge en el tanque de electroforesis perfectamente sellada por los dos extremos.
- Se somete a una corriente de 60 voltios durante una hora, tiempo suficiente para que el DNA salga de la agarosa y se quede ligeramente adherido a la membrana de diálisis por su interior.
- Se recoge todo el tampón de electroforesis que ha quedado dentro de la membrana, lavando repetidamente las paredes interiores con una pipeta pasteur de plástico.

IV. Purificación por mini-columnas:

1. Añadir al tampón de electroforesis que contiene la sonda la cantidad de NaCl 3M necesaria para que quede a una concentración de 0.32 M.
2. Preparar las minicolumnas (Elutip-d, S+S, Ref. 462 626) para la purificación de la sonda, inyectando 3 ml de NaCl 1 M en TE 20/1 (Tris, pH 5.4, 20 mM / EDTA 1 mM).
3. Inyectar ahora 5 ml de NaCl 0.4 M preparado en TE 20/1.
4. Pasar la solución, conteniendo la sonda, a través de la columna con presión suave e inyectando de 1 en 1 ml.
5. Lavar la columna con una inyección de 800 µl de NaCl 0.4 M en TE 20/1 con la misma jeringa utilizada para inyectar la sonda.
6. Eluir la sonda, retenida en la columna, inyectando 1 ml de NaCl 1 M en TE 20/1.
7. Añadir al eluido de la columna 2 volúmenes de etanol absoluto.
8. Mezclar y dejar toda la noche a -20°C.
9. Centrifugar a 15.000 rpm durante 30 minutos y a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante, dejar el precipitado que se seque al aire.
11. Resuspender el precipitado en 500 µl de agua bi-distilada. Medir su concentración al espectrofotómetro y ajustarla a 5 ng/µl.

4.2 Tratamiento del DNA genómico con endonucleasas de restricción.

Los procesos que se describen a continuación se sumarian en la figura 21.

Ia Digestión

- Las muestras se digieren en tubos eppendorf de 1.4 ml
- Se utilizará enzima en la proporción de 5 unidades por microgramo de DNA
- La temperatura y buffer de incubación deben de estar de acuerdo con lo recomendado por las diferentes casas comerciales de las enzimas. En general se incubará a 37°C para todas las enzimas excepto TaqI y BclI. El buffer debe ser comercial, o si se ha preparado en el laboratorio debe estar filtrado y no descongelado más de una vez. Se utilizarán buffers concentrados 10 veces respecto al buffer de incubación. Se recomienda añadir a los buffers espermidina (concentración final de 2 mM) cuando el buffer se haya preparado en el laboratorio, no cuando sea comercial.

-La enzima se añadirá en 3 dosis a intervalos de 1 hora, y la incubación se hará durante toda la noche excepto con TaqI que se hará de 1 hora.

-Pasos a seguir para realizar las digestiones:

- a) Poner el DNA en el tubo (previamente homogeneizamos el tubo de donde lo vamos a coger)
- b) Añadir el agua destilada
- c) Añadir el buffer 10x
- d) Añadir la enzima. Las enzimas se conservan a -20°C.

Coger de una vez todo lo que se vaya a utilizar sin sacar el tubo madre del congelador. La enzima se añade en 3 dosis (conservarla a -20°C entre cada paso, y en hielo o estratocooler cuando se saca del congelador). Primero, añadir 1/3 de la cantidad total de enzima que se vaya a utilizar a todos los DNAs. Mezclar suavemente, y poner las muestras en un baño de agua a 37°C (6 la temperatura correspondiente). Una hora después, centrifugar los tubos en una microfuga durante 10 segundos, añadir otro 1/3 de enzima, agitar suavemente y volver a poner en el baño. Por último, una hora después, microfugar otros 10 segundos, añadir el último 1/3 de enzima, agitar suavemente y dejar en el baño toda la noche.

EJEMPLO

Concentracion inicial	DNA	buffer	enzima
	200ug/ml	10x	8 U/ul
Volumen a usar	50 ul	10 ul	3 x 2.1 ul
llevar volumen final a 100 ul con agua destilada			

*Especial para TaqI: esta digestión se realiza a 65°C y se considera completa en 3 horas. Se procederá igual que con las otras enzimas, pero se considera terminada la digestión 1 hora después de añadir la última dosis de enzima.

Ib Control de digestión

-centrifugar cada tubo eppendorf 10 segundos en una microfuga

-tomar una décima parte del contenido (normalmente 10 ul) y correrlo en un gel de agarosa al 0.7% durante al menos 2 horas a 70 voltios.

-RESULTADOS POSIBLES:

- a) Se obtiene un "smear"; resultado correcto. La reacción

se para añadiendo EDTA 0.5 M (3 ul) y se procede a concentrar las muestras.

b) En muy raros casos, el DNA no se digiere bien: añadir de nuevo enzima e incubar 2 horas adicionales. Si no mejoran los resultados se puede deber a:

(1) mala resuspensión del DNA: se somete a nuevo tratamiento de resuspensión.

(2) la muestra no está suficientemente limpia (cociente 260/280 bajo). Se extrae de nuevo con fenol-cloroformo y se precipita con isopropanol.

(3) la enzima está en malas condiciones: cambiar de lote o de casa comercial.

c) En algunas ocasiones se produce sobredigestión. En estos casos, el DNA puede estar degradado antes de la digestión. En estos casos repetir el proceso con mayor cantidad de DNA y en vez de dejar incubando toda la noche, incubar sólo 3-4 horas.

II. CONCENTRACION DE LAS MUESTRAS

Se puede hacer de 2 modos

II.a En una centrifuga conectada a vacío (SAVANT):

-poner el Eppendorf conteniendo el digerido, una vez realizado el control de digestión y después de haber detenido la reacción con EDTA

-dejar los tubos abiertos en la centrifuga (SAVANT), ponerla a funcionar con calor durante aproximadamente 1 hora (se puede controlar la concentración cada 30 minutos) y conectada a la bomba de vacío.

-Se puede concentrar hasta unos 16 ul. Normalmente se concentra más y habrá que añadir agua destilada: 13 ul.

II.b Precipitación con etanol:

-añadir al eppendorf que contiene el digerido Acetato sódico 3 M para que quede a una concentración de 0.3 M en la muestra

-Añadir a continuación 2 volúmenes de Etanol al 100%

-Mezclar suavemente

-Mantener en HIELO durante 10 minutos

-Centrifugar 30 minutos en una microfuga a 14.000 rpm

y a 4°C

-Eliminar el etanol aspirando a vacío

-Secar en la SAVANT o a temperatura ambiente (más lento)

-Resuspender en 16 ul de agua destilada (lavando cuidadosamente las paredes del tubo)

-Incubar 30 minutos a 37°C

-Centrifugar 10 segundos en una microfuga.

III. CARGA DE LAS MUESTRAS EN EL GEL

-Preparar "Loading buffer 5x" (BPB 5x)

-Añadir 4 ul de BPB 5x a los 16 del digerido

-Calentar las muestras 5 minutos a 65°C (incluyendo los marcadores de peso molecular.

-Centrifugar en una microfuga 10 segundos

-Resuspender suave y cargar "muy lentamente" 20 ul por pocillo.

IV. MARCADORES DE PESO MOLECULAR

-Son muy variados los marcadores de peso molecular que hay en el mercado y se pueden usar. Todo depende del peso molecular de las bandas que esperamos obtener. Pero en líneas generales usando dos marcadores se cubre casi todo el espectro de

los pesos que se obtienen en Southern.

-Usaremos rutinariamente 2 marcadores por gel (uno a cada lado de las muestras): fago lambda digerido con Hind-III y fago lambda digerido con EcoRI y Hind-III.

4.3 Electroforesis y transferencia a filtros de Nylon

-Preparar los geles y buffers tal y como se especifica en el apéndice 3.

-En general se utilizan geles del 0.7% de agarosa. Pero pueden utilizarse otros porcentajes.

*0.9% (como en el caso de la Hemofilia B) para resolución de fragmentos pequeños.

*0.6% para resolución de fragmentos grandes.

-Antes de añadir el gel a la bandeja de electroforesis comprobar que el Paine es de 1 mm de grosor.

-Una vez solidificado el gel y frío añadir las muestras (20 ul por pocillo)

-Migración:

*Proteger la parte vertical de los electrodos con cinta de contraste.

*Dejar recircular buffer de electroforesis conectando la cubeta a una bomba peristáltica. (sobre todo cuando se deja toda la noche o se trabaje por encima de 70 voltios).

-Seleccionar la corriente (fijada a voltaje constante):

*Para diagnóstico prenatal o de portadores y reordenamiento de genes:

18 a 24 horas a 40-45 voltios

*Para sondas HLA:

-0.7%: 40 horas a 30 voltios

-0.9%: 48 horas a 25 voltios

-0.6%: 43 horas a 40 voltios

-Hacer una fotografía al final de la migración (incluyendo en la misma una regla o similar que nos permita saber cuantos centímetros ha migrado cada una de las bandas del marcador de peso molecular.

I. TRANSFERENCIA A MEMBRANA NYLON (Z-probe, Biorad)

I.a Tratamiento del gel

-Cortarlo a la altura de los pocillos

-A temperatura ambiente y con agitación suave y constante:

a) Sumergirlo en HCl 0.15 M durante 10 minutos. Retirar el ácido, sumergirlo en agua y retirarlo.

b) Sumergirlo en NaOH 0.2 M / NaCl 0.6 M durante 30 minutos. Retirar el líquido y lavar con agua.

c) Sumergir el gel en Tris pH 7.6 0.5 M / NaCl 1.5 M durante 30 minutos. Retirarlo y lavar con buffer de transferencia al menos 5 minutos.

I.b El Sistema de Transferencia

-El sistema de transferencia consta (de abajo a arriba) de:

*Bandeja metálica conteniendo el buffer fosfato y cruzada por un cristal.

*Un puente que consta de 3 capas de papel Whatman 3MM previamente impregnadas con buffer fosfato (Tamaño: 22 x 46 cm).

*2 capas de papel 3 MM previamente impregnadas en buffer fosfato (Tamaño: 21 x 23.5 cm).

*el gel tratado como se ha descrito

anteriormente y rodeado de una película radiográfica o parafilm.

- *la membrana de nylon previamente mojada en buffer fosfato y con una esquina cortada indicando el pocillo nº 1 (Tamaño: 21 x 22 cm).

- *6 capas de papel Whatmann 3MM previamente mojadas en buffer fosfato (Tamaño: 20 x 22.5 cm).

- *Una torre de papeles de filtro cortados de unos 15-20 cm de altura.

- *Un cristal o superficie plana

- *Un peso de 4-5 Kg.

-Dejar que el sistema funcione toda la noche (pudiéndose hacer un cambio de papeles que se hayan empapado cada 2 horas de haberlo puesto). Hay que asegurarse que hay suficiente buffer fosfato en la bandeja.

-Al quitar el sistema, lavar la membrana con buffer fosfato limpio, lo que ayudará a desprenderse los posibles fragmentos de agarosa que hayan quedado adheridos a la membrana.

- Dejar secar al aire unos minutos

- Cocer 2 horas a 80°C o hacer fijación por ultravioleta (pendiente de testar).

4.4 Hibridación con sondas marcadas y autorradiografía

I. MARCAJE DE SONDAS POR RANDOM PRIMER

I.a Procedimiento de marcaje

- Por cada membrana de nylon completa:

- *mezclar 25 ng de la sonda (5 ul) con 250 pg de DNA de fago lambda (1 ul)

- *hervir durante 2 minutos, poner en hielo 5 minutos

- *centrifugar en minifuga 10 segundos

- *añadir 5 ul de OLB 5x

- *añadir 8.7 ul de agua bidestilada

- *añadir 4 ul de alfaP32 dCTP a 10 uCi/ul (>3.000 Ci/mMol)

- *Finalmente añadir 1.3 ul de la enzima de Klenow (fragmento Klenow de la DNA polimerasa I)

- *Es importante seguir este orden estrictamente. El volumen final es de 25 ul.

- *Incubar a temperatura ambiente (en la campana adecuada) desde 3 horas hasta toda la noche.

- *eliminar los nucleótidos no incorporados pasando la mezcla a través de una columna de Sephadex G200 (en pipetas de plástico de 10 ml).

- *Contar 2 ul (+ 2 ml de líquido de centelleo) en el contador beta para calcular la actividad específica.

- *Se pueden marcar en un mismo tubo mayores cantidades de sonda respetando las proporciones de los diferentes reactivos utilizados.

II. PREHIBRIDACION E HIBRIDACION

I.a Prehibridación:

- Poner la membrana (después de fijar el DNA por cocción a 80°C) en una bolsa de plástico con 30 ml de líquido de prehibridación.

- Sellar la bolsa a calor cuidando de no dejar burbujas de aire.

- Incubar de 4 horas a toda la noche a 42°C con agitación.

I.b Hibridación:

- Mezclar la sonda marcada y purificada por sephadex con 500 ul de ssDNA en un tubo falcon.

- Hervir 10 minutos, poner en hielo 5 minutos.

- Añadir 20 ml de líquido de prehibridación y mezclar cuidadosamente.

- Cortar la bolsa de plástico de la prehibridación por una esquina y dejar salir el máximo de líquido posible.

- Añadir a la bolsa los 20 ml de la mezcla de hibridación conteniendo la sonda marcada.

- Sellar la bolsa a calor cuidando de no dejar burbujas de aire.

- Masajear con la mano para homogeneizar

- Incubar durante 24-40 horas a 42°C con agitación.

I.c Lavados:

- Con agitación suave:

- Lavar con SSPE 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente dos veces.

- Monitorizar con el gelger el marcaje que queda en la membrana

- Lavar con SSPE 2x / SDS 0.5% a 65°C durante 15 minutos máximo (dependiendo del marcaje que quedara)

- Lavar con SSPE 0.5x a 65°C durante 15 minutos máximo (dependiendo del marcaje que quedara)

Se pueden realizar prehibridaciones e hibridaciones simultáneas de varias membranas con la misma sonda en una caja Tupperware, teniendo cuidado de repartir los líquidos de hibridación entre las membranas y de que no queden burbujas de aire.

También se pueden hacer lavados de varias membranas en un mismo Tupper poniendo 200 ml de las soluciones de lavado por cada membrana (no más de 5 membranas)

III. AUTORADIOGRAFIA

- Dejar secar las membranas al aire (sobre un papel de filtro o papel 3MM).

- Envolverlas en plástico fino transparente (reynolon)

- Limpiar un chasis de radiografía con líquido antiestático y dejar secar al aire 5-10 minutos.

- En el cuarto oscuro, con luz roja situar la membrana envuelta entre 2 películas Kodak X-OMAT-AR fijando con cinta adhesiva la película de abajo sobre el chasis y la membrana envuelta. Dejar la película de enzima suelta.

- Sacar al día siguiente la película superior (suelta)

- Según los resultados se colocará una nueva película o no y se decidirá el tiempo de exposición adecuado.

IV. DESHIBRIDACION

- En un baño a 42°C con agitación:

- *Lavar 30 minutos con NaOH 0.4M

- *Lavar 30 minutos con Tris 0.2 M pH 7.5 / SDS 0.5% / SSPE 0.1X

- Monitorizar con el gelger que no queda marcaje en la membrana

- Las membranas se pueden guardar en bolsas de plástico, bien secas, bien en líquido de prehibridación

- Se pueden deshibridar varias membranas juntas en un Tupperware (200 ml por membrana y no más de 5 membranas).

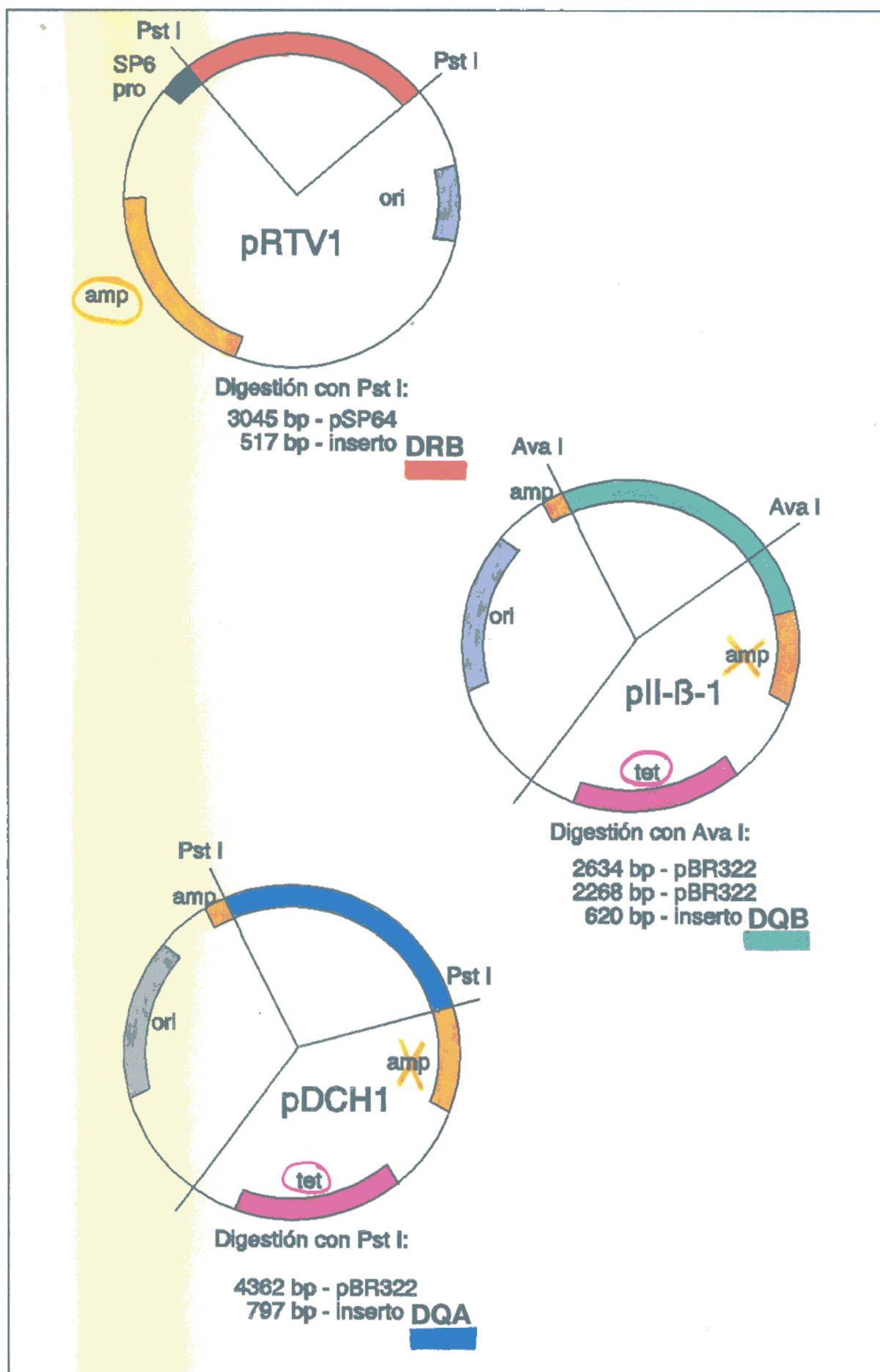


Figura 20. Vectores y sondas utilizados para tipificar HLA-DRB, DQB y DQA (Bidwell y Jarrold, 1986).

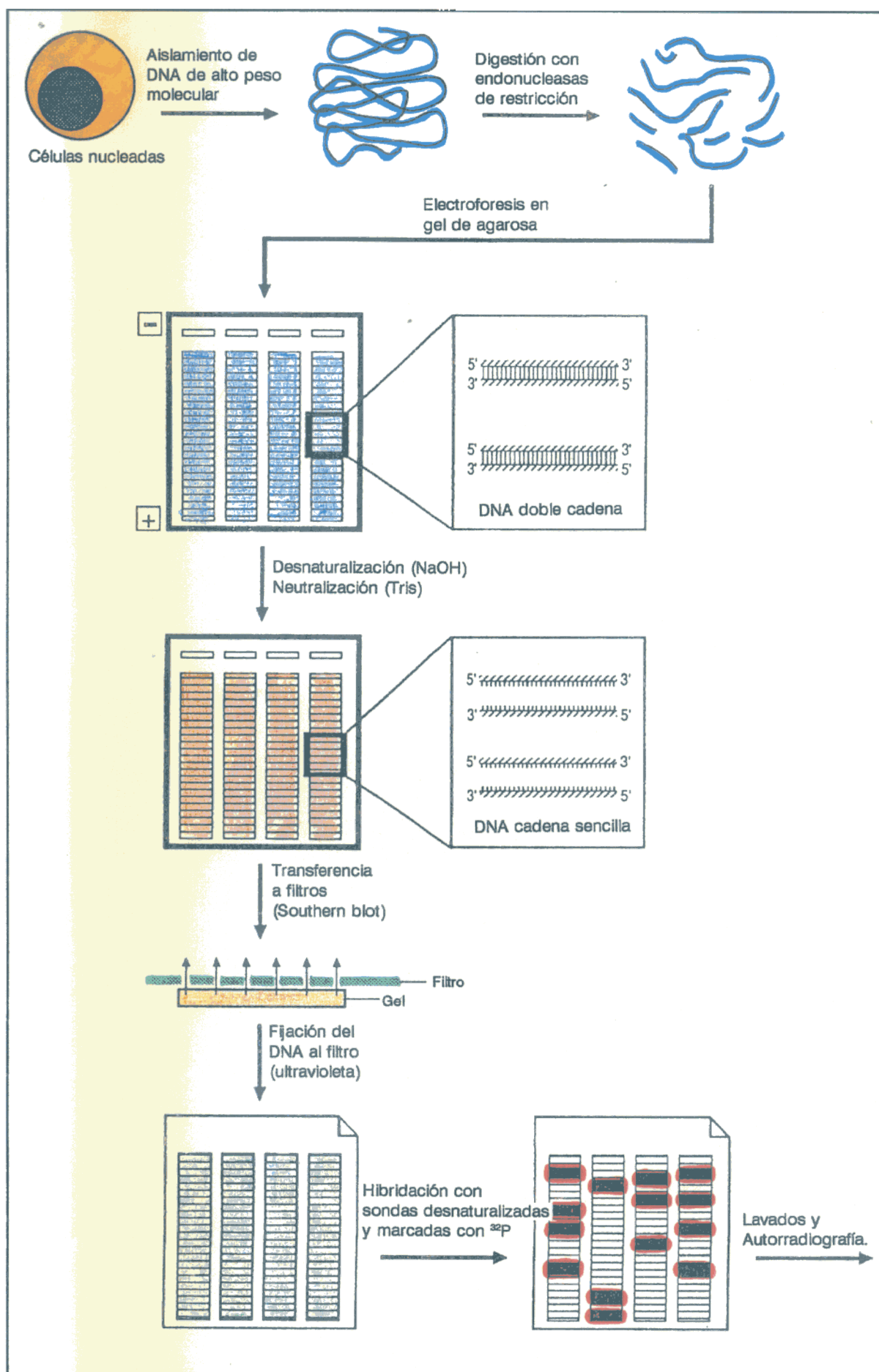


Figura 21. Esquema de la tecnología de Southern para la obtención de fragmentos de restricción (RFLPs).

5. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés: Polymerase Chain Reaction) es, desde un punto de vista teórico, un método sencillo para amplificar fragmentos de ácidos nucleicos. Partiendo de una muestra con un sustrato DNA de cualquier origen, la reacción PCR se basa en la repetición de un ciclo constituido por tres etapas:

- a) Desnaturalización
- b) Anillamiento ó hibridación
- c) Elongación o Polimerización

En la primera etapa (desnaturalización), la doble cadena del DNA sustrato se desnaturaliza, separándose las dos cadenas al incubar la muestra a alta temperatura (93-97°C). Estas dos cadenas permanecerán separadas libres en la disolución hasta que la temperatura sea lo suficientemente baja (37-55°C) para permitir la renaturalización (ver figura 22). Si al bajar la temperatura, la mezcla de reacción contiene, en relativamente alta concentración, oligonucleótidos sintéticos complementarios a ciertas zonas del DNA sustrato, estos oligonucleótidos sintéticos (denominados primers o cebadores) se hibridarán preferentemente a las cadenas sustrato de DNA, bloqueando la renaturalización de las cadenas de DNA originales. Es evidente que son necesarios dos primers; uno complementario a una de las cadenas y el otro a la otra cadena, de forma que ambos se hibriden a zonas de las cadenas DNA sustrato sobre los flancos del segmento DNA que deseamos amplificar. La secuencia de estos primers viene determinada por la secuencia de las cadenas DNA sustrato, siendo necesario que las secuencias de los primers no sean complementarias entre sí.

Los primers, formados idealmente por 20-28 nucleótidos, se hibridan sobre cadenas diferentes de forma que sus extremos 3' (desde los cuales se inicia la polimerización) estén uno enfrente del otro (ver figura 22). La última etapa del ciclo consiste en la polimerización o extensión (en dirección 5' a 3') del complejo primer-DNA sustrato mediante una enzima DNA polimerasa que incorpora los deoxinucleótidos monofosfato (dNMPs), a partir de los trifosfato (dNTPs) presentes en la disolución. La polimerasa que se utiliza preferencialmente es la denominada Taq-polimerasa (extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*, Saiki y col., 1985).

5.1 Oligonucleótidos empleados.

Se listan a continuación los oligonucleótidos empleados en las diferentes partes de que consta este trabajo (para PCR, oligotipaje y secuenciación):

GH46	5'-CCGGATCCTTCGTGTCCACAGCAGC-3'
GH50	5'-CTCCCAACCCCGTAGTTGTGTCTGCA-3'
DRB-500	5'-GCCTGCTGCTCTGGCCCC-3'
DRB-300	5'-GTCACTGCACTTCAGCTCA-3'
DRB-600	5'-TCCATAAACGGGAGGACAAC-3'
DRB-600c	5'-GTTCTCCTCCCGTTTATGGA-3'
DRB-601	5'-AATCGGGACAAGGTGGACAC-3'
DRB-602	5'-AAGCGGGACAAGATGGACGA-3'
DRBAmpA	5'-CAGATGTCCTCTCCCTCT-3'
DRBAmpB	5'-GCGTACCAACGCTCACT-3'
DRB6125	5'-CCCAGCTCACAGGCACTC-3'
M13(-21)	5'-TGTAACACGACGGCCACT-3'

En la figura 23 se muestra la localización y dirección de estos oligonucleótidos en un gen HLA-DRB genérico.

AwpA : CCC CACAGCA CGTTTCTTG
AwpB : CCGCTGCACTGTGAAGCTCT

5.2 Reacciones de amplificación de DNA

La mezcla de reacción de PCR para amplificar DNA genómico constaba de:

- DNA genómico: 1 µg
- KCl 50 mM
- Tris, pH 8.3, 10 mM
- MgCl₂ 1.5 mM
- Gelatina 0.01 %
- dATP 200 µM
- dCTP 200 µM
- dGTP 200 µM
- dTTP 200 µM
- Primer o cebador 1, 1 µM
- Primer o cebador 2, 1 µM
- Taq polimerasa, 2.5 Unidades enzimáticas (Perkin elmer Cetus, U.S.A.)
- todo ello en un volumen final de 100 µl

Las parejas de primers utilizadas para la amplificación de DNA fueron:

GH46-GH50 (amplificación genérica DRB; Scharf y col., 1989)

DRBAmpA-DRBAmpB (amplificación genérica DRB; Morales y col., 1991)

DRBAmpA-DRB6125 (amplificación específica de DRB6)

Las condiciones de amplificación que se aplicaron en el DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) o en el PCR-9600 (Perkin Elmer Cetus) fueron:

Desnaturalización previa (95°C) durante 5 minutos

30 ciclos constando de 3 pasos:

Desnaturalización a 95°C	30 segundos
Hibridación a 55°C	1 minuto
Extensión a 72°C	2 minutos

Extensión final a 72°C durante 5 minutos.

5.3 Reacciones de amplificación de RNA

El RNA monocatenario no sirve como sustrato para la Taq-polimerasa y en general para ninguna DNA polimerasa. Por ello antes de realizar la reacción de PCR hay que sintetizar una hebra de DNA complementario (cDNA) al RNA mensajero.

La síntesis de la hebra de cDNA complementaria al RNA mensajero se realiza en un volumen final de 20 µl que contiene:

- 0.2 a 2 µg de RNA citoplásmico total
- 5 Unidades de inhibidor de RNAsas
- 1 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- KCl 50 mM
- Tris-Cl 20 mM
- MgCl₂ 20 mM
- oligo(dT)₁₈ 0.1 µg

- 100 Unidades enzimáticas de la Transcriptasa Inversa AMV

Esta mezcla se incuba durante 1 hora a 42°C. Posteriormente se inactiva la enzima por calentamiento (10 minutos a 65°C). Sin purificación necesaria, el 25% del producto de esta síntesis se puede utilizar en una reacción PCR como la descrita para DNA genómico, tanto en composición de la mezcla de reacción como en las condiciones de tiempo y temperatura de cada ciclo.

Las parejas de primers utilizadas para reacciones a partir de RNA fueron:

DRB-500/DRB-300: amplifican los transcritos completos de todos los genes HLA-DRB

DRB-500/DRB-600c: amplificarían (hipotéticamente) la porción 5' de los transcritos del gen DRB6

DRB-600/DRB-300: amplificarían (hipotéticamente) la porción 3' de los transcritos del gen DRB6

DRB-600/DRB-AmpB: amplificarían (hipotéticamente) una porción del exón-2 de los transcritos del gen DRB6.

5.4 Controles de amplificación

Al ser la técnica de PCR tan extremadamente sensible (pudiendo producir más de un millón de copias de la región flanqueada por los primers utilizados) es necesario ser muy cuidadoso en lo que se refiere a la contaminación de muestras.

Por ello, en todas las reacciones, tanto a partir de DNA como de RNA, se introduce un control NEGATIVO, que consta de los mismos ingredientes que una reacción estándar, sustituyendo el sustrato (DNA o RNA) por agua destilada.

Pero además, en el caso de las amplificaciones a partir de RNA, cuando se utilizan primers que pertenecen ambos al mismo exón (como el caso de la pareja DRB-600/DRB-AmpB) hay que utilizar un control de CONTAMINACION DE DNA, pues si hubiere DNA contaminante en la muestra de RNA se podría amplificar resultando en falsos positivos. Este control consiste en someter a una muestra de RNA a todos los tratamientos omitiendo el uso de Transcriptasa Inversa. Por lo tanto no va a haber síntesis de cDNA y si se produce un resultado positivo se deberá a presencia de trazas de DNA.

El control de amplificación se realiza sobre geles de Agarosa al 1% o Agarosa NuSieve al 2% en presencia de buffer TEA 1x y teñidos con bromuro de etidio. En cada pocillo se carga la mezcla resultante de:

- 10% del producto de PCR (10 µl)
- 10 µl de agua bi-destilada
- 5 µl de BPB 5x

Una vez cargado en los pocillos, con marcadores de peso molecular adecuado para poder identificar el tamaño del amplificado, las muestras se someten a electroforesis durante 2 horas (100 voltios), visualizándose finalmente el resultado al aplicar el gel sobre un transiluminador ultravioleta (254 nm). El resultado clásico de un control de amplificación se muestra en la figura 24.

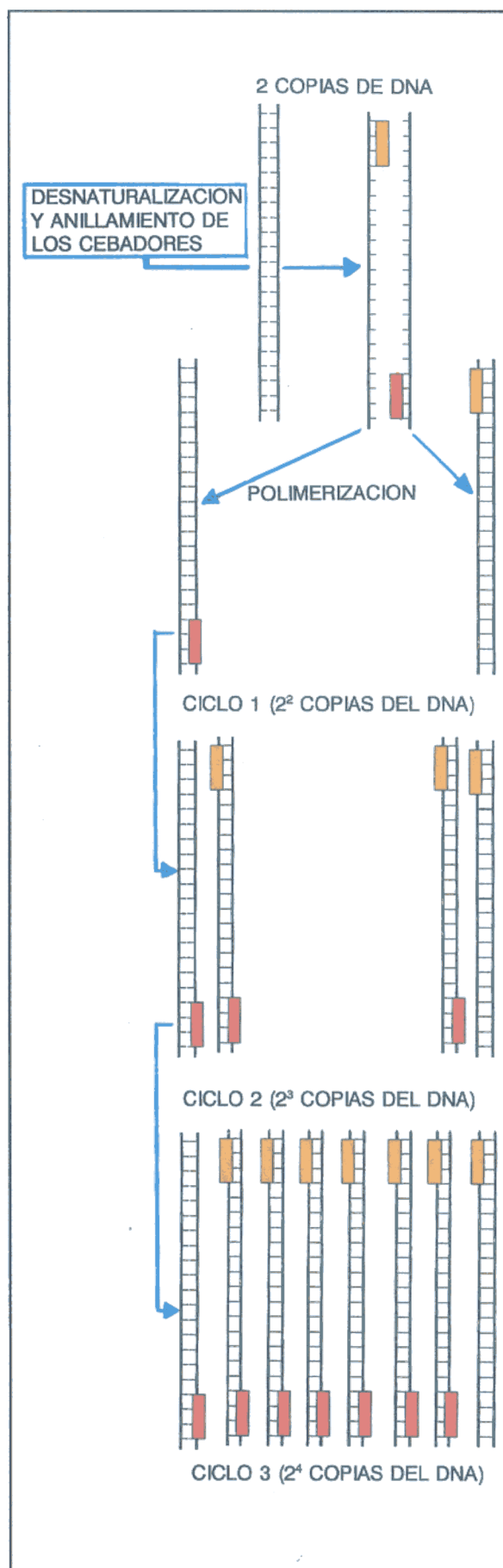


Figura 22. Esquema de una reacción de amplificación básica (PCR): los primeros ciclos.

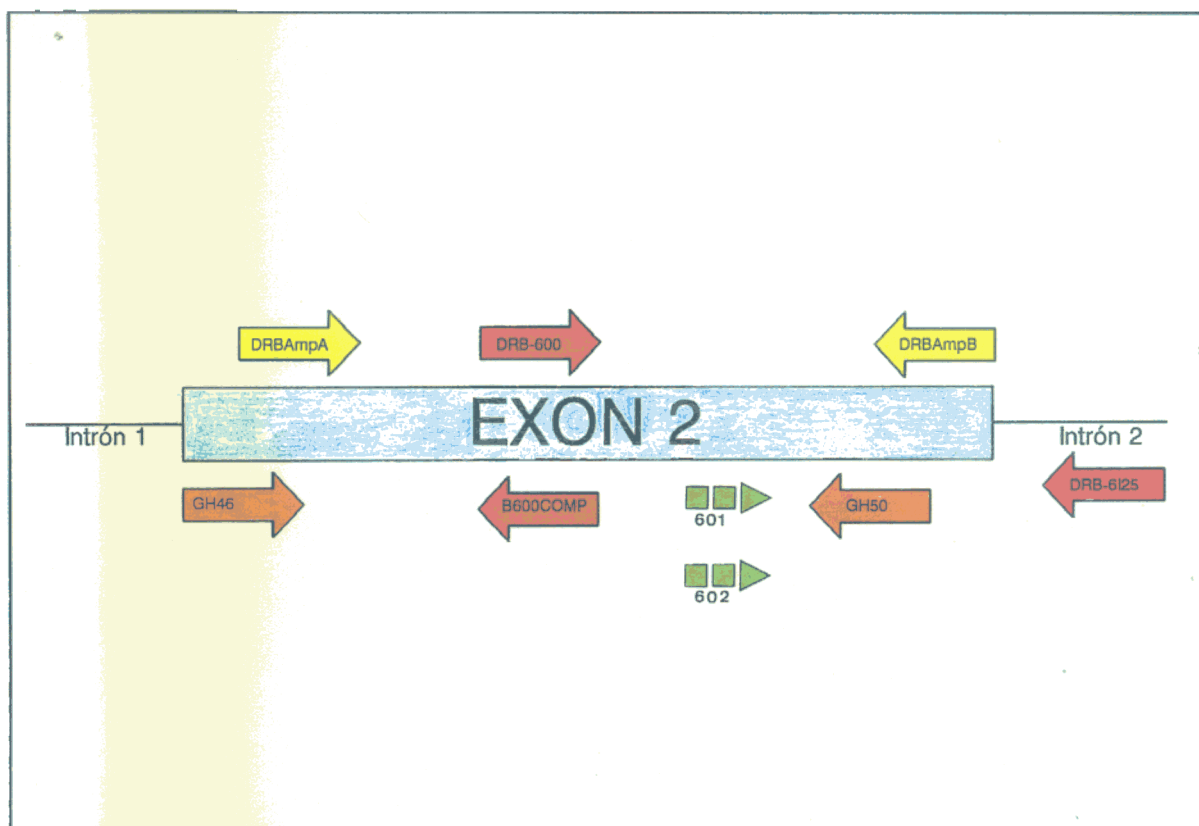


Figura 23. Localización de los diferentes oligonucleótidos utilizados en un gen HLA-DRB genérico.

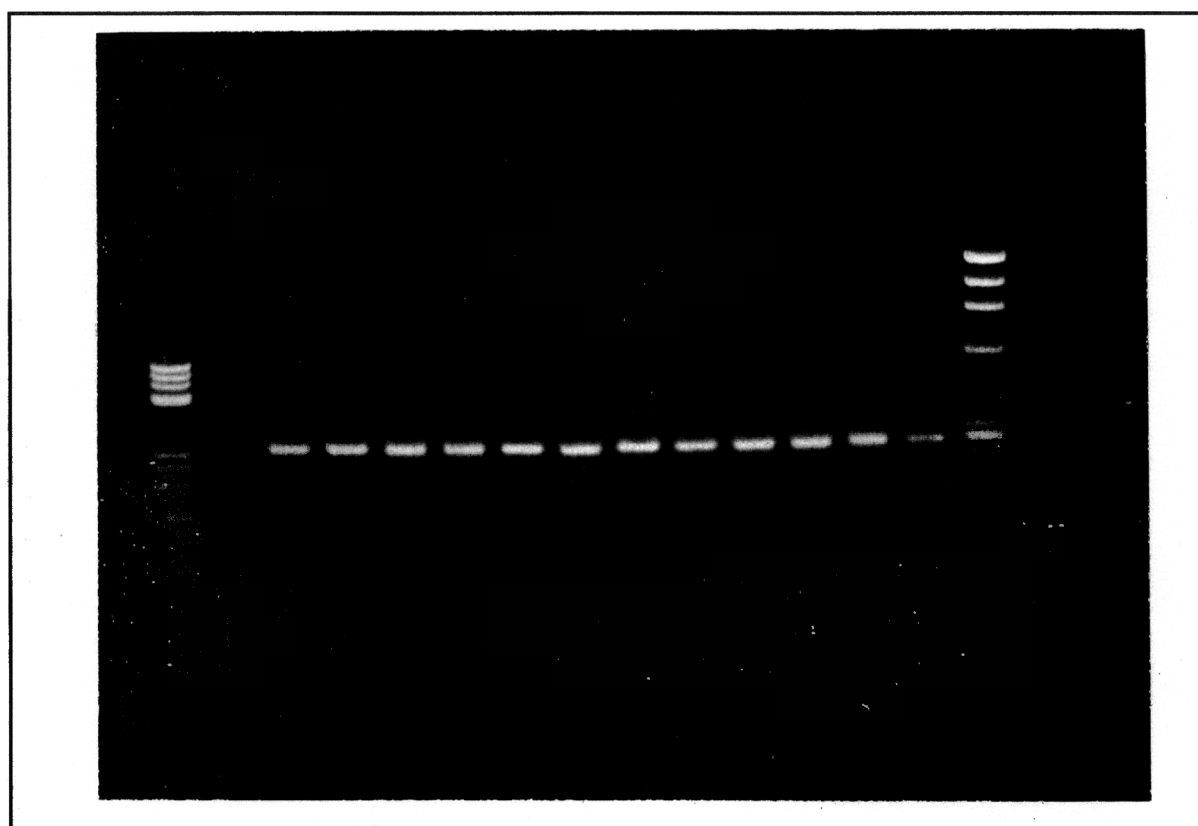


Figura 24. Control de amplificación por PCR. Resultado modelo.

6. Técnica de tipaje con oligosondas (Oligo-Tipaje)

6.1 Transferencia del DNA amplificado a filtros de nylon:

Cuando la PCR se ha realizado para oligotipaje, un 5% del producto total obtenido (5 µl) se desnaturaliza con NaOH 0.4 N durante 10 minutos a temperatura ambiente:

- 5 µl de reacción PCR
- 10 µl de agua bi-distilada
- 10 µl de NaOH 1 M

A continuación, esta mezcla se neutraliza con 25 µl de NH₄-acetato 2 M. Inmediatamente, las muestras se añaden sobre una membrana de nylon (Hybond N, Amersham) usando el aparato de dot-blot de Bio-rad (ver figura 25).

Mientras se prepara el aparato para su uso, las muestras deben mantenerse en hielo. La membrana debe empaparse en NH₄-acetato 1 M. Una vez colocada la membrana en el aparato, se hace pasar a través de todos los pocillos (dots) 0.5 ml de NH₄-acetato 1M; a continuación el producto de la PCR previamente desnaturalizado y neutralizado y finalmente otros 0.5 ml de NH₄-acetato 1 M.

Se desmonta el aparato y se deja secar la membrana al aire. Para que el DNA se fije a la membrana se incuba ésta durante 2 horas en una estufa a 80°C.

6.2 Marcaje radioactivo de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para hibridar los productos de la amplificación DRB fueron:

- DRB-600
- DRB-601
- DRB-602

Para marcar estos oligonucleótidos se realiza la siguiente mezcla:

- 70 ng del oligonucleótido a marcar
- 70 µCi de (γ-³²P)ATP
- 2 µl de Tampón kinasa 10x
- 5 Unidades enzimáticas de T4 polinucleótido kinasa (Pharmacia, Uppsala, Suecia)

La mezcla se mantiene durante 30 minutos a 37°C. A continuación se añade 1 µg de DNA carrier (1 µl de ssDNA a 1 mg/ml) y 9 µl de agua bi-distilada.

Se inactiva la kinasa por calor (68°C durante 10 minutos) y posteriormente se purifica el oligonucleótido marcado a través de una columna cromatográfica de penetrabilidad de Sephadex G-50 (13 ml).

6.3 Hibridación de los filtros, lavado y autorradiografía

La hibridación de los DNAs amplificados con las sondas marcadas nos va a permitir detectar diferencias de secuencias de hasta 1 sola base. Para ello hay que ser muy estrictos en las temperaturas de hibridación y lavado de cada oligonucleótido específico. Recientemente, se ha incorporado a esta técnica la utilización de una sal de amonio cuaternario 6 TMAC (del inglés: TetraMethyl-Ammonium Chloride) (Wood y col., 1985); con el uso del TMAC las temperaturas de hibridación y lavado ya no van a depender del contenido de bases G y C del oligo, sólo van a depender de su longitud. Las temperaturas de hibridación y lavado que se proponen a continuación son para oligonucleótidos de 18 bases (para oligonucleótidos de 20 bases habría que subir 2°C ambas temperaturas).

Para la prehibridación, se coloca la membrana (tal y como se ha preparado en el apartado 6.1) en una bolsa de plástico. Se moja con 10 ml de SSPE 4x. Se retira el SSPE 4x sobrante y se añaden 10 ml de TMAC PARA HIBRIDACION (apartado 1). Se sella la bolsa con calor evitando que queden burbujas de aire en el interior y se incuba el conjunto durante 1 hora (mínimo) a 54°C.

Cortando una esquina de la bolsa y sin derramar líquido, se introducen de 30 a 60 ng (5 a 10 pmoles) del oligonucleótido marcado con ³²P (tal y como se ha preparado en el apartado 6.2). Se vuelve a sellar la bolsa con calor y se incuba a 54°C durante 3-16 horas con agitación constante.

Pasado el tiempo de hibridación, se extrae el filtro de la bolsa y se realizan los siguientes lavados (con agitación constante):

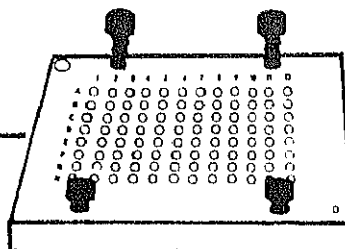
1. 100 ml de SSPE 2x / SDS 0.1% durante 10 minutos a temperatura ambiente (2 veces).
2. 100 ml de SOLUCION TMAC durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
3. 100 ml de SOLUCION TMAC, durante 10 minutos y a 58°C (2 veces).

Se pueden lavar varios filtros a la vez, añadiendo 50 ml de cada solución de lavado por cada filtro adicional.

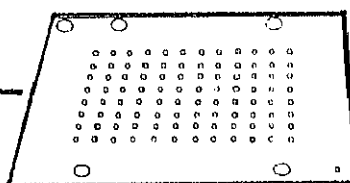
Se dejan secar los filtros al aire. Se envuelven en plástico muy fino (Reynolon) y se exponen a autorradiografía colocados junto a películas Kodak XOMAT-XAR5, a -80°C y de 12 a 24 horas.

Si se quieren reutilizar los filtros, una vez hibridados, hay que someterlos a un lavado para desprender el oligonucleótido anterior: Tris, pH 8.0, 10 mM / SDS 0.5 % durante 15 minutos a 70°C (1 ó 2 veces).

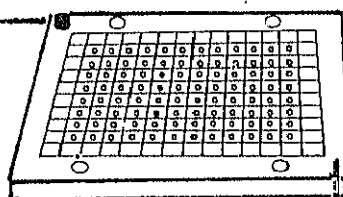
Plantilla de carga de muestras
(placa superior) y tornillos
de ajuste.



Plantilla de goma

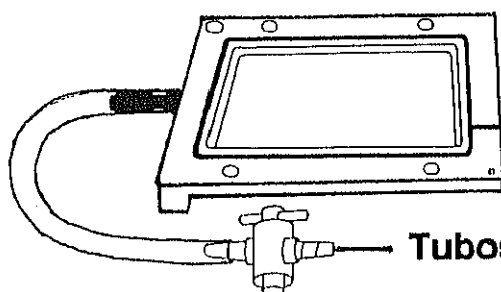


Tornillo-guía



Placa inferior (soporte)

Tornillo-guía



Reservorio de vacío

Anillo de goma

Tubos y válvula de flujo

Figura 25. Modelo básico del aparato de Dot-blot, para transferencia de DNA por vacío.

7. Secuenciación de DNA

(Sambrook y col., 1989)

7.1 Preparación del bacteriofago M13.

Para clonar dentro del bacteriofago M13, es necesario un paso primero de linearización con la enzima que se vaya a utilizar para el clonaje. En el caso de productos de PCR, como tienen extremos romos (no protuberantes) se utilizan alternativamente Sma-I o Hinc-II como enzimas de corte. En nuestro trabajo, la preparación del M13 se realizó en todos los casos con Sma-I.

Se coloca en un tubo tipo "eppendorf", y con un volumen final de 20 µl los siguientes productos:

- 10 µg de DNA de M13mp18 en su forma replicativa
- 2 µl de Tampón Sma-I 10x
- 50 unidades enzimáticas de Sma-I (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)
- agua bi-distilada hasta ajustar el volumen

La mezcla se incuba durante 1 hora a 24°C. Se añaden 200 µl de TE 1x. Y se realizan dos lavados (extracciones): el primero con 225 µl de PCI y el segundo con 225 µl de Cloroformo / Isoamílico (24/1).

A la fase acuosa resultante se le añaden 20 µl de Acetato sódico 3M y 450 µl de etanol absoluto. Se incuba la mezcla durante 30 minutos a -80°C. Posteriormente se centrifuga durante 10 minutos, a 4°C y a 10.000 rpm para precipitar el DNA. Se extrae el etanol a vacío y se lava el precipitado con 500 µl de Etanol al 70%. Se vuelve a extraer el etanol, se deja secar completamente el precipitado, y una vez seco se resuspende en 20 µl de agua bi-distilada.

Posteriormente se hace una medida espectrofotométrica a 260 y 280 nm para estimar su pureza y concentración. Y se diluye hasta dejarlo a una concentración de 50 ng/µl.

7.2 Clonado del material amplificado en el bacteriofago

El producto de PCR sobrante del control de amplificación (90 µl) se corre en un gel de agarosa preparativo al 1% durante 2 horas a 90-100 voltios. Pasado este tiempo, se sitúa sobre un espectrofotómetro ultravioleta y se visualiza la banda del material amplificado (tamaño adecuado). La banda se recorta con un escalpelo estéril y se somete a electroelución (ver apartado 4.1).

El material electroeluido se precipita con acetato sódico y etanol absoluto, se lava con etanol al 70% y se resuspende en 20 µl de agua bi-distilada (del mismo modo que se ha hecho con el fago M13 en el apartado 7.1). Se ajusta su concentración a 8 ng/µl.

A continuación se procede al "ligado" de los dos materiales genéticos (M13 y producto amplificado) del siguiente modo:

- 1 µl (50 ng) de M13 mp18 cortado con Sma-I
 - 1 µl (8 ng) del producto de PCR purificado
 - 1 µl de Tampón Ligasa 10x
 - 1 µl de T4 DNA ligasa (40.000 Unidades enzimáticas; New England Biolabs, U.S.A.)
 - 1 µl de agua bi-distilada
- La mezcla se incuba durante toda la noche a 16°C

7.3 Preparación de bacterias competentes y transfección

Se pincha una colonia aislada de E.coli (cepa TG1, Sambrook y col., 1989) que ha sido crecida en placas de medio mínimo M9 y se inocula en 5 ml de medio líquido TY 2x (en tubos de 50 ml para que el cultivo esté aireado). Se crece el cultivo toda la noche a 37°C y 150 rpm.

Del medio anterior, a la mañana siguiente se inoculan 400 µl en 40 ml de medio fresco TY 2x y se incuba durante 2 horas a 37°C y agitación (hasta que la O.D. a 550 nm sea de 0.2). Del mismo cultivo de toda la noche, en paralelo, se inocula una gota en 20 ml de medio fresco TY 2x y se incuba de 1 a 2 horas.

El cultivo de 20 ml se mantiene a 4°C hasta su uso como cespel bacteriano. El cultivo de 40 ml se centrifuga durante 10 minutos a 4.500 rpm y 4°C.

Se decanta el sobrenadante, y el precipitado se resuspende en 20 ml de CaCl₂ 50 mM preenfriado a 0°C y estéril. La suspensión bacteriana se deja en hielo durante 30 minutos, agitándola cada 10 minutos.

Se centrifuga a 4.500 rpm durante 10 minutos y a 4°C. Se decanta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 4 ml de CaCl₂ 50 mM frío. En esta suspensión las bacterias ya son competentes y deben usarse en 24 horas conservándolas a 0°C entretanto.

Se mezcla en un tubo tipo "eppendorf" los siguientes productos:

- 5 µl del ligado obtenido en el apartado 7.2
- 45 µl de TE 1x estéril
- 300 µl de bacterias competentes en CaCl₂

La mezcla se incuba en hielo acuoso durante 40 minutos. A continuación se incuba durante 3 minutos a 42°C y se vuelve a colocar sobre hielo.

Se funde el Top Agar H (3 ml por cada experimento de transfección) y se deja enfriar hasta 42°C. Por cada experimento de transfección que se vaya a realizar se realiza la mezcla:

- 200 µl de bacteria crecida exponencialmente (inóculo de 20 ml que se guardó en la nevera)

-40 µl de IPTG (100 mM en agua destilada)

-40 µl de X-gal (al 2% en Dimetil-formamida)

A cada tubo conteniendo las células competentes transfectadas con el M13-inserto se le añade:

- 270 µl de la mezcla TG1/IPTG/X-gal
- 3 ml de Top Agar H

Se mezcla suavemente (para no producir burbujas) y se deposita inmediatamente sobre una placa H precalentada a 37°C. Se agita suavemente hasta confluencia y se espera hasta que solidifique el Top Agar. Una vez solidificado, las placas se incuban invertidas durante una noche a 37°C.

7.4 Selección y amplificación de los clones recombinantes.

Con la introducción del IPTG y X-gal en las placas de cultivo y el uso de la cepa TG1 de *E. coli*, es posible hacer una selección de los clones recombinantes por color: las placas de lisis de bacteriófago nativo se van a colorear de azul, en tanto que las placas de lisis de fago M13 recombinante (con inserto) no se van a poder colorear y tienen un aspecto blanquecino.

Inocular una colonia aislada de *E. coli* TG1 en un tubo de 50 ml conteniendo 5 ml de medio TY 2x. Incubar toda la noche a 37°C y 150 rpm.

A la mañana siguiente, hacer una dilución 1:100 de este cultivo con medio TY 2x fresco.

Pinchar con una aguja de siembra una placa recombinante (blanca) e inocularla sobre 5 ml del cultivo anterior en tubos de 50 ml.

Agitar vigorosamente (250 rpm) a 37°C entre 6 y 7 horas (no es conveniente que este cultivo se extienda más de 7 horas, porque puede haber muerte bacteriana y aparecer nuestra muestra contaminada con DNA, RNA y restos celulares bacterianos).

Centrifugar el cultivo a 2.500 rpm. durante 10 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio estéril. (en el sobrenadante se encuentran las partículas infectivas del fago M13 que son de DNA monocatenaria; en el precipitado y dentro de las bacterias se encuentra la forma replicativa del M13 que es de DNA bi-catenario)

Centrifugar el sobrenadante a 2.500 rpm durante 10 minutos y transferir a un nuevo tubo.

Tomar 1.8 ml de sobrenadante y añadir 360 µl de Solución PEG para producir la agregación de las partículas virales. Mezclar vigorosamente e incubar durante 30 minutos a 4°C.

Centrifugar la suspensión a 10.000 rpm durante 10 minutos para precipitar las partículas virales. Aspirar y desechar el sobrenadante procurando no dejar trazas del PEG.

Resuspender el precipitado en 400 µl de TE 10/1. Para retirar las proteínas virales, se realizarán a continuación las siguientes extracciones:

- (2x) 400 µl de PCI: añadir el PCI, agitar vigorosamente, incubar a temperatura ambiente y centrifugar a 10.000 rpm durante 3 minutos. Pasar la fase acuosa superior a un tubo limpio y repetir el proceso.

- (2x) 400 µl de eter etílico (saturado con agua): añadir el eter, agitar vigorosamente, centrifugar inmediatamente a 10.000 rpm durante 1 minuto. Retirar la fase orgánica superior por aspiración a vacío y repetir el proceso.

Añadir 40 µl de Acetato sódico, pH 5.2, 3 M y 800 µl de etanol absoluto. Mezclar bien y incubar durante 30 minutos a -80°C o durante toda la noche a -20°C.

Centrifugar la mezcla durante 15 minutos a 10.000 rpm y 4°C. Desechar el sobrenadante y añadir sobre el precipitado 400 µl de Etanol al 70% preenfriado a -20°C. Centrifugar 5 minutos a 10.000 rpm y 4°C. Desechar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a vacío durante 5 minutos.

Resuspender el precipitado en 20 µl de agua bi-distilada. Realizar lecturas espectrofotométricas a 260 y 280 nm para determinar la pureza y concentración del DNA. Disolver las muestras con agua bi-distilada hasta una concentración de 250 ng/µl (1 O.D. a 260 nm equivale a una concentración de 33 µg/ml; aproximadamente 2 µg de DNA monocatenario equivalen a 0.8 pmoles).

7.5 Reacciones de secuenciación

(Gocayne y col., 1989)

Una vez purificado el DNA monocatenario de M13 (conteniendo el inserto de interés) se realizan las reacciones de secuenciación (copia) siguiendo básicamente el método descrito por Sanger (Sanger y col.,). Se pueden utilizar diferentes enzimas como polimerasas. Las enzimas utilizadas en este trabajo fueron 2: Sequenasa y Taq polimerasa.

La Sequenasa (U.S.B., U.S.A.) es una modificación de la DNA polimerasa del bacteriófago T7, en tanto que la Taq polimerasa es una polimerasa que trabaja a alta temperatura (72°C) y se obtiene a partir de *Thermus aquaticus*.

Además, en este trabajo se utilizaron primers o cebadores de secuenciación fluorocromados en lugar de realizar un marcaje radioactivo. Los 4 primers diferentes (denominados JOE, FAM, TAMRA y ROX) se combinan con las 4 reacciones diferenciales de secuenciación (A, C, G y T, respectivamente), como se esquematiza en la figura 26.

7.5.1 REACCIONES CON SEQUENASA

Se utilizan 4 tubos de microcentrífuga marcados A, C, G y T respectivamente y se mezcla en ellos las cantidades y productos que se muestran en la Tabla 2.

Estas mezclas se incuban a 56°C durante 5 minutos. Transcurridos éstos, se dejan enfriar lentamente a temperatura ambiente durante un periodo de 20-30 minutos. Una vez fríos los tubos, se centrifugan unos segundos para recoger en el fondo las gotas de condensación.

Preparar las mezclas de nucleótidos de reacción del siguiente modo:

d/ddA: 1 vol. dNTP mix + 1 vol. ddATP 50 µM
d/ddC: 1 vol. dNTP mix + 1 vol. ddCTP 50 µM
d/ddG: 1 vol. dNTP mix + 1 vol. ddGTP 50 µM
d/ddT: 1 vol. dNTP mix + 1 vol. ddTTP 50 µM

Preparar la enzima (Sequenasa) del siguiente modo:

-1 µl de enzima (a 10-12 Unidades/µl)
-4.5 µl DTT 0.1 M
-3.5 µl de Tampón Sequenasa 5x

Añadir a cada reacción de anillado: 1.5 µl (en el caso de los tubos A y C) o 4.5 µl (en el caso de los tubos G y T) de las mezclas de nucleótidos correspondientes. Añadir 1 µl (para A y C) ó 3 µl (para G y T) de la enzima preparada.

Incubar las reacciones de extensión durante 5 minutos a 37°C. Se puede añadir un "pulso" de enzima Klenow para que las reacciones inacabadas se completen, pero no es estrictamente necesario.

Calentar todos los tubos a 65°C durante 10 minutos para desactivar las enzimas. Centrifugar unos segundos para recoger en el fondo de los tubos las gotas de condensación.

Juntar las 4 reacciones de cada clon (A, C, G y T) en uno de los 4 tubos. Añadir 6 µl de Acetato sódico, pH 5.2, 3M y 200 µl de etanol absoluto.

Agitar para mezclar bien e incubar las mezclas en hielo durante unos 20 minutos. Centrifugar las precipitaciones durante 30 minutos a 10.000 rpm. Desechar el sobrenadante por aspiración.

Lavar el precipitado con 500 µl de etanol al 70% preenfriado. Centrifugar 5 minutos a 10.000 rpm, desechar el sobrenadante y secar el precipitado a vacío durante 5 minutos. Este precipitado seco está listo para cargar en los geles de secuenciación, o en su caso conservar durante varios meses a -20°C y en oscuridad.

7.5.2 REACCIONES CON TAQ POLIMERASA

Se preparan igualmente 4 tubos rotulados como A, C, G y T, pero de 0.7 ml (los que se utilizan para la técnica de PCR). Se preparan las mezclas de nucleótidos del siguiente modo:

A/ddA: 1 vol. dA mix + 1 vol. ddATP 3 mM
C/ddC: 1 vol. dC mix + 1 vol. ddCTP 1.5 mM
G/ddG: 1 vol. dG mix + 1 vol. ddGTP 0.25 mM
T/ddT: 1 vol. dT mix + 1 vol. ddTTP 2.5 mM

También la enzima (Taq polimerasa) se prepara diluida, del siguiente modo:

-10 Unidades de Taq polimerasa
-2 µl de Tampón Taq de dilución
-Agua bi-distilada hasta 20 µl de volumen final

A continuación se mezclan en cada tubo el DNA monocatenario, nucleótidos, tampones y enzimas del modo indicado en la tabla 3.

Estas mezclas se someten a 30 ciclos (como los de PCR) del siguiente modo:

15 PRIMEROS CICLOS:

-Desnaturalización a 95°C durante 30 segundos
-Anillamiento a 55°C durante 30 segundos
-Elongación a 70°C durante 1 minuto

15 CICLOS FINALES:

-Desnaturalización a 95°C durante 30 segundos
-Anillamiento/elongación a 70°C durante 1 minuto

Pasados los 30 ciclos, se junta el contenido de los 4 tubos en uno sólo (A+C+G+T) y se le añade 140 µl de Etanol 92% / Acetato sódico 0.1 M

La mezcla se incuba en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se centrifuga 30 minutos a 4°C y 10.000 rpm. El sobrenadante se aspira a vacío y el precipitado se lava con 500 µl de etanol al 70% preenfriado. Se vuelve a centrifugar 5 minutos y a desechar el sobrenadante. El precipitado se deseca a vacío durante 5 minutos y se carga en el gel o se congela a -20°C y en oscuridad.

7.6 Carga de los productos en el gel, detección y obtención de las secuencias.

Para preparar los geles de secuenciación, se mezcla:

-50 g de Urea
-15 ml de Acrilamida al 40%

-2 g de resina de intercambio iónico

con lo que se consigue un gel al 6% de acrilamida y 8.3 molar de Urea. Se agita la mezcla magnéticamente y con calor hasta que se disuelva totalmente y se calienta a unos 50°C. A continuación se filtra a través de un filtro de 0.2 µm, se le añaden 10 ml de TBE 10x y se enrasa a 100 ml con agua bi-distilada.

Los cristales de secuenciación se lavan con detergentes que no produzcan residuos y agua caliente, frotando con un pedazo de papel blando (tissue). Se aclaran abundantemente con agua del grifo y, cuando ya no quedan restos de detergente, con agua bi-distilada. Finalmente se lavan con etanol al 95% y se dejan secar en posición vertical.

Una vez secos, se prepara el sandwich cristal-españadores-cristal. Se sellan los laterales y el fondo con cinta adhesiva plástica. A la solución de acrilamida filtrada, se le añaden 500 µl de Persulfato de amonio al 10% y 45 µl de TEMED. Se agita suavemente y se carga entre los dos cristales, en posición vertical y cuidando que no se formen burbujas. Cuando el interior de los cristales está lleno hasta 2 cm del borde superior, se sitúan en posición horizontal, se coloca el peine de secuenciación, y se fija con 3 pinzas metálicas. El conjunto, se deja polimerizar durante 1 a 2 horas.

Una vez polimerizada la acrilamida, se retiran las pinzas, el peine y la cinta adhesiva. Se lava abundantemente con agua del grifo y finalmente con etanol al 95%. A continuación se coloca en el interior de la cubeta del secuenciador automático 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA). Una vez puesto el cristal, y comprobada la lectura del laser, se rellenan con tampón TBE 1x las cubetas de electroforesis superior e inferior. Se conectan los cables de tensión, se limpian los pocillos de restos de acrilamida y se realiza una cámara previa de electroforesis durante 30 minutos, a 1.500 voltios, 20 mAmpierios, 30 Watts.

Las muestras, preparadas como se ha descrito en el apartado 7.5 se resuspenden en 1 µl de EDTA, pH 8.0, 50 mM y 5 µl de Formamida desionizada. Se mezcla con cuidado y repetidamente para conseguir la resuspensión. A continuación se centrifugan los tubos unos segundos para recoger todo el líquido en el fondo. Se calientan durante 2 minutos a 90°C para desnaturalizar el DNA y se meten inmediatamente en hielo. Así están listas para ser cargadas en los pocillos del gel. Una vez cargadas, se someten a electroforesis en las mismas condiciones que la pre-carrera, durante 14 horas.

En el secuenciador, se programan los nombres de los clones introducidos en cada pocillo. Pasados unos 15-20 minutos desde que comenzó la electroforesis definitiva se da orden de recogida de datos. Un rayo laser excita a las moléculas que pasan, y éstas, al llevar fluorocromos conjugados emiten en una determinada longitud de onda (diferente según que haya terminado en A, C, G ó T). La emisión se filtra por los 4 colores posibles, se fotomultiplica y se envía al ordenador (ver Figura 27).

Acabada la electroforesis, el ordenador integra todas las emisiones fluorescentes recibidas, normaliza el espacio entre las diferentes señales y realiza un asignación de bases. El resultado se conserva en un fichero en el disco duro y se produce una impresión en colores por medio de un plotter (Figura 28). La secuencia, se puede editar en pantalla y ser corregida por el operario.

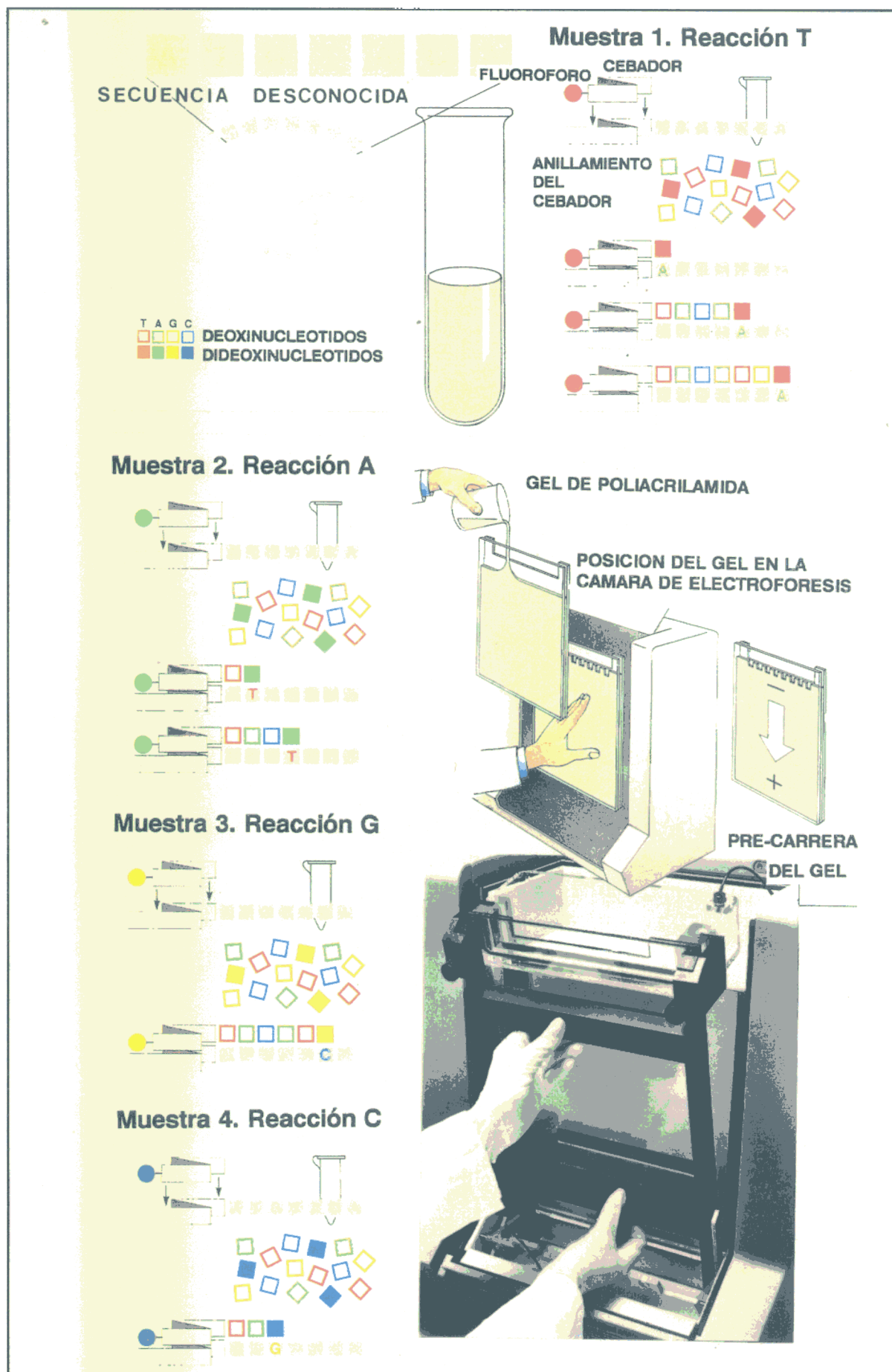


Figura 26. Esquema de las reacciones de secuenciación utilizando primers conjugados con fluoroforos.

Tabla 2

Reacciones de anillamiento con Sequenasa: composición

Reactivo	Reacción A	Reacción C	Reacción G	Reacción T
DNA molde	0.1 pmol	0.1 pmol	0.3 pmol	0.3 pmol
Primer (0.2 pmol/μl)	1 μl JOE	1 μl FAM	3 μl TAMRA	3 μl ROX
Tampón Sequenasa 5x	1 μl	1 μl	3 μl	3 μl
Agua bi-distilada	variable	variable	variable	variable
Volumen final	5 μl	5 μl	15 μl	15 μl

Tabla 3

Reacciones de secuenciación con Taq polimerasa: composición

Reactivo	Reacción A	Reacción C	Reacción G	Reacción T
DNA molde	0.1 pmol	0.1 pmol	0.2 pmol	0.2 pmol
Primer (0.2 pmol/μl)	1 μl JOE	1 μl FAM	2 μl TAMRA	2 μl ROX
Tampón Taq 5x	1.8 μl	1.8 μl	3.6 μl	3.6 μl
Solución d/ddN	1μl(A/ddA)	1μl(C/ddC)	2μl(G/ddG)	2 μl(T/ddT)
Taq diluida	2 μl	2 μl	4 μl	4 μl
Agua bi-distilada	variable	variable	variable	variable
Volumen final	9 μl	9 μl	18 μl	18 μl

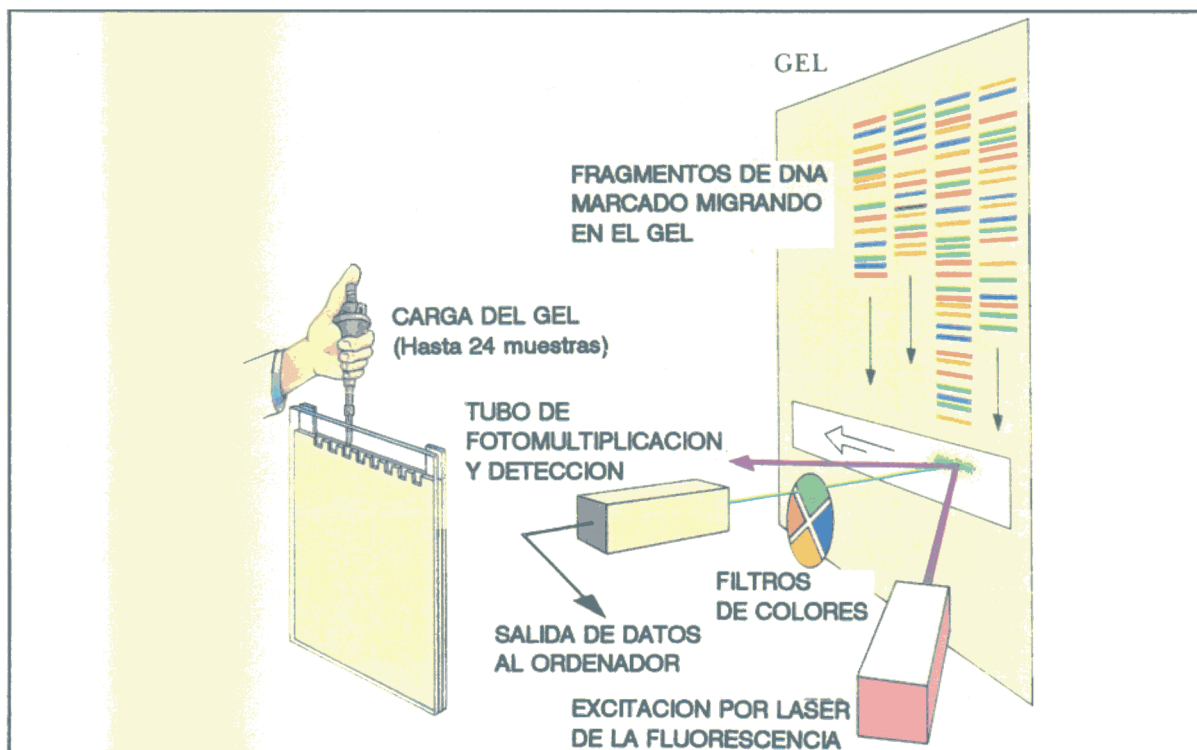


Figura 27. Esquema del funcionamiento interno del secuenciador: recogida de datos y envío al ordenador de control.

8. Análisis de Secuencias

8.1 Programa para predicción de estructura secundaria de proteínas.

Para la predicción de estructura secundaria a partir de una secuencia de aminoácidos se utilizó el programa GARNIER del paquete informático PC-GENE (IntelliGenetics, CA, U.S.A.). Este programa predice estructuras secundarias (hélices, láminas extendidas, giros y random) basándose en el método de Garnier, Osguthorpe y Robson (Garnier y col., 1978).

Para cada aminoácido de una secuencia, el programa realiza 4 ecuaciones para cada uno de los estados conformacionales posibles (hélice alfa, lámina beta, giros beta ó estructura random). A cada aminoácido se le asigna, pues, un valor para cada una de las 4 estructuras posibles. Estas ecuaciones tienen en cuenta el efecto que sobre un residuo determinado ejercen los 8 residuos adyacentes (4 a cada lado). Posteriormente, se propone una "Constante de decisión", que se resta a cada uno de los 4 valores. De los valores restantes, el que sea más alto determina el estado conformacional que se le asigna a cada aminoácido.

Los valores asociados a cada aminoácido se basan en estudios cristalográficos o de estructura terciaria de proteínas conocidas. También se tienen en cuenta los valores de diroísmo circular, que predicen el porcentaje de una proteína en estructura secundaria. La validez del método de Garnier se ha comparado con otros métodos existentes (Busetta y Hospital 1982; Kabsch y Sander, 1983) y se ha observado que, para proteínas de estructura terciaria conocida, el método tiene una precisión de un 56-57%. Por tanto, resulta un método más aceptable que el Chou y Fasman (con una precisión inferior al 50%).

Una vez metida la secuencia de aminoácidos a analizar, el programa realiza los computos y dibuja un símbolo debajo de cada aminoácido:

X: alfa hélice
>: giro beta
-: lámina beta
*: estructura random

8.2 Programa para cálculo de homología entre secuencias y construcción de dendrogramas:

Los árboles o dendrogramas filogenéticos se construyeron a partir de las secuencias de DNA utilizando el programa CLUSTAL del paquete informático PC-GENE (IntelliGenetics, CA, U.S.A.), programa que se basa en el método de Wilbur and Lipman (Higgins y Sharp, 1988; Higgins y Sharp, 1989; Wilbur y Lipman, 1983).

El programa calcula un valor de similaridad para cada pareja de secuencias que se someten a comparación, mediante un alineamiento inicial de todas las secuencias analizadas. En un segundo paso, se construye el dendrograma utilizando los valores de similaridad obtenidos para cada pareja en el alineamiento inicial. El método que se utiliza para construir los dendrogramas se denomina UPGMA (del inglés: Unweighted Pair Group Maximum Averages). El método UPGMA comienza agrupando en una rama las dos secuencias más similares. Posteriormente, calcula los valores de similitud de esta rama con cada una de las secuencias restantes. En pasos posteriores, se van agrupando las 2 secuencias más similares en nuevas ramas y se calculan nuevos valores de similitud para cada una de las ramas que se establezcan. Si la similitud entre una secuencia o rama nueva con una rama generada en los primeros pasos es mayor que con las secuencias aisladas que quedan, se agrupan varias ramas entre sí formando una rama aún mayor.

9. Individuos, Familias y Líneas Celulares

9.1 Individuos no relacionados

Se estudiaron un total de 88 individuos sanos no relacionados, para el total de los trabajos realizados. Todos ellos, excepto 4, fueron tipificados para HLA-DR por serología, y muchos por RFLPs:

- * 32 se utilizaron para la secuenciación de todos sus genes HLA-DRB (Tabla 4)
- * 44 se utilizaron para oligo-tipaje de HLA-DRB6 tras una amplificación genérica de HLA-DRB (Tabla 5). 4 de los individuos de este estudio se utilizaron también para secuenciación.
- * 5 se utilizaron para la secuenciación del alelo HLA-DRI3b (Tabla 8)
- * 14 se utilizaron para la secuenciación de fragmentos más largos del exón 2 y distinción de los subtipos HLA-DRB6*0201 y HLA-DRB6*0202 (Tabla 12)

9.2 Familias

Dos familias, de 5 individuos sanos cada una, se utilizaron para estudiar la segregación de los alelos de HLA-DRB6 en los diferentes haplotipos. Una de las familias portaba un cromosoma DR1, y la otra un cromosoma DR2. Su tipaje serológico, así como por RFLPs se muestra en la Tabla 11.

9.3 Líneas celulares

Un total de 52 células homocigotas de tipaje de los dos últimos Talleres internacionales de Histocompatibilidad se utilizaron con diferentes propósitos:

- * 14 únicamente para estudios de secuenciación de todos sus genes HLA-DRB
- * 19 para oligo-tipaje de DRB6
- * 19 para ambos estudios (secuenciación y oligotipaje, Tablas 6 y 7).

Tabla 4

Tipaje HLA-DR serológico y RFLP de los individuos no emparentados utilizados en estudios de secuenciación

Nº	Individuo	Serología HLA-DR	Tipaje DR-RFLP
1	AMM	2,X	15,15
2	PSL	5,6,52	12,13a1
3	PL	4,5,52,53	4,12
4	MLS	3,5,52	17.1,12
5	EGS	6,X,52	13a3,13b
6	JGJ	6,7,52,53	13b,7.1
7	JMM	2,X	15,15
8	MP	3,X,52	17.1,"Br"
9	OGS	5,6,52	11,13b
10	DYC	5,6,52	11,13b
11	JRS	6,7,52,53	13b,7.1
12	JRB	4,6,52,53	4,13b
13	AGC	7,X,53	7.1,"Br"
14	AGR	4,X,53	4,"Br"
15	OSS	4,6,52,53	4,13b
16	EGR	4,X,53	4,"Br"
17	MRS	6,7,52,53	13b,7.2
18	MPC	3,X,52	17.2,"Br"
19	BAC	4,X,53	4,"Br"
20	CC	5,6,52	11,13a1
21	VRS	2,7,53	15,7.2
22	JRS	2,7,53	15,7.2
23	JS	7,X,53	7.1,7.2
24	866	4,X,53	4,4
25	867	4,7,53	4,7.2
26	868	4,X,53	4,4
27	869	4,7,53	4,7.2
28	876	2,4,53	15,4
29	877	4,7,53	4,7.2
30	725	3,X,52	17.1,17.2
31	726	4,7,53	4,7.2
32	727	3,4,52,53	17.2,4
33	728	3,7,52,53	17.2,7.2
34	729	3,4,52,53	17.2,4
35	730	3,4,52,53	17.1,4
36	MGA	2,6,52	15,13b

Tabla 5

Tipaje HLA-DR serológico y RFLP de los individuos no emparentados utilizados en estudios oligo-tipaje de HLA-DRB6

Nº	Individuo	Serología HLA-DR	Tipaje DR-RFLP
3	MPC	3,X,52	17.2,*Br*
4	EGR	4,x,53	4,*Br*
8	201	4,2,53	4,16,
18	692	4,7,53	4,7.1
19	711	4,7,53	4,7.1
29	753	6,7,52,53	13a4,7.2
30	JRS	6,7,52,53	13b,7.1
31	OSS	4,6,52,53	4,13b
44	424	10,3,52	10,17.2
45	435	10,3,52	10,17.1
46	077	10,6,52	10,13a4
47	148	10,6,52	10,13a3
51	6224	ND	ND
52	6225	ND	ND
53	7818	ND	ND
54	8138	4,x,53	ND
55	8189	ND	ND
56	7774	13,52	ND
57	7817	1,7,53	ND
58	7843	2,7,53	ND
59	7989	11,10,52	ND
60	7999	1,2	ND
61	8000	2,7,53	ND
65	HOM-2	1,x	ND
66	RAJI	3,10,52	ND
67	ALCL	2,3,52	15,17.1
68	003	1,x	1,1
69	072	2,x	15,15
70	5550	3,8,52	ND
71	5551	2,4,53	ND
72	6231	2,x	ND
73	6233	1,2	ND
74	6160	1,2	ND
75	3935	1,2	ND
76	261	10,9,53	ND
77	226	10,1	ND
78	8132	1,6,52	ND
79	8133	1,2	ND
80	8134	10,3,52	ND
81	8135	10,3,52	ND
82	3411	10,7,53	20,7.1
83	3256	10,7,53	10,7.2
84	3985	10,7,53	10,7.2
85	5471	10,6,52	10,14a
86	5475	10,4,53	10,4

Tabla 6

Celulas homocigotas de Tipaje utilizadas para secuenciación genérica de sus genes HLA-DRB

Nº Workshop	Nombre	Serología HLA-DR	Tipaje Dw	TCD DRw52
9002	MZ070782	1	20	
9003	KAS116	1	1	
9004	JESTHOM	1	1	
9005	HOM2	1	1	
9006	WT100BIS	1	1	
9008	D0208915	15	2	
9010	AMAI	15	2	
9011	E4181324	15	12	
9016	RML	16	22	
9018	LOO81875	3	3	25
9019	DUCAF	3	3	25
9020	QBL	3	3	25
9022	COX	3	3	24
9023	VAVY	3	3	24
9033	BM14	4	4	
9034	SAVC	4	4	
9036	SPOO10	11	DB2	25
9038	BM16	12	DB6	25
9040	BM15	11	5	25
9050	MOU	7	17	
9051	PITOUT	7	17	
9054	EK	14	9	25
9057	TEM	14	9	25
9058	OMW	13	18	24
9059	SLE005	13	19	26
9060	CB6B	13	18	25
9061	31227ABO	14	9	25
9063	WT47	13	19	26
9064	AMALA	14	16	25
9066	TABO89	8	8.3	
9069	MADURA	8	8.1	
9075	DK5	9	23	
9088	PF04015	3	—	24

Tabla 7

Celulas homocigotas de tipaje utilizadas en los estudios de oligo-tipaje del gen HLA-DRB6

Nº Workshop	Nombre	Serología HLA-DR	Tipaje Dw	TCD DRw52
9002	MZ070782	1	20	
9004	JESTHOM	1	1	
9008	D0208915	15	2	
9011	E4181324	15	12	
9016	RML	16	22	
9019	DUCAF	3	3	25
9022	COX	3	3	24
9088	PF04015	3	—	24
9021	RSH	3	nuevo	24
9025	DEU	4	4	
9026	YAR	4	10	
9030	JHAF	4	13	
9092	BM92	4	14	
9107	LKT3	4	15	
9040	BM15	11	5	25
9039	JVM	11	nuevo	25
9036	SPOO10	11	DB2	25
9042	TISI	11	nuevo	25
9105	FPAF	11	FS	—
9038	BM16	12	DB6	25
9060	CB6B	13	18	25
9058	OMW	13	18	24
9063	WT47	13	19	26
9057	TEM	14	9	25
9064	AMALA	14	16	24
9050	MOU	7	17	
9052	DBB	7	11	
9093	BER	7	7	
9047	PLH	7	DB1	
9067	BTB	8	8.1	
9071	OLGA	8	8.2	
9066	TABO89	8	8.3	
9070	LUY	8	8.3	
9075	DKB	9	23	
9076	T7526	9	—	
9W0104	MDE	1		
9W0404	SUD	4		
9W0701	BOR	7		



Resultados

1. Caracterización de la secuencia de DNA del exón 2 del alelo HLA-DR13b:

1.1 Definición del alelo HLA-DR13b

La especificidad HLA-DR13b, que es un subtipo de HLA-DR6, y que se define por RFLP (Bidwell y col., 1988) es difícil de tipar y se puede confundir con HLA-DR12 (un subtipo de HLA-DR5, Betuel y col., 1984; Schreuder y col., 1984). Incluso utilizando la técnica de RFLP como modo de tipaje, el patrón que se ha obtenido para las células homocigotas 13b es idéntico al que se obtiene para células homocigotas DR18 (que es un subtipo raro del HLA-DR3). Los compendios de secuencias publicados previamente a la confección de este trabajo (Marsh y Bodmer, 1989), no incluían la secuencia de este alelo.

1.2 Selección de individuos no emparentados con tipificación HLA-DR13b.

Al no disponer en nuestro laboratorio de la célula homocigota para la especificidad DR13b, tuvimos que seleccionar individuos que portaran en heterocigosis dicha especificidad. Para ello se realizó la tipificación de HLA-DR y -DQ por serología y entre los individuos DR6, se eligieron los que eran DQ3, porque el alelo DR13b suele ir acompañado de dicho DQ. Estos individuos se tipificaron por el sistema de RFLP descrito para DRB, DQA y DQB y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Fenotipos HLA-DR y -DQ, determinados por serología y RFLP en los 5 individuos utilizados.

INDIVIDUOS	SEROLOGIA		RFLPs		
	HLA-DR	HLA-DQ	DRA	DQA	DQB
MRS	6,7	2,3	13b,7.2	3,3b	2b,3b
EGS	6	1,3	13b,13a3	1b,3b	1a,3b
OSC	5,6	3	11,13b	3b,3b	3b,3b
MGA	2,6	1,3	15,13b	1b,3b	1b,3b
JRS	6,7	2,3	13b,7.1	3,3b	2b,3b

1.3 Identificación de la secuencia del exón 2 de HLA-DR13b:

De cada individuo analizado se obtuvieron diferentes secuencias del exón 2 correspondientes a alelos de diferentes loci DRB, puesto que el sistema de amplificación por PCR con los oligonucleótidos GH46 y GH50 no es específico para ningún locus. Todas estas secuencias, procedentes de los genes DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 ó DRB7 se compararon con las previamente publicadas (Marsh y Bodmer, 1989) y se asignaron a los diferentes alelos. Finalmente quedó una secuencia que no estaba publicada y que compartían los 5 individuos analizados, y se asignó como exón 2 del alelo DR13b (Figura 29).

Con la secuencia de nucleótidos del exón 2, y aplicando el código genético, se obtuvo la secuencia de proteínas del dominio β 1. El alineamiento de esta nueva secuencia de proteínas con las más similares previamente conocidas (diferentes subtipos de DR5 y DR6) demuestra que pertenece a este grupo de reacción cruzada (Grupo del DR52), por compartir con ellos los residuos 9-12 de la primera región

hipervariable ("EYST", ver figura 30), pero además, presenta un fragmento de dos residuos ("SA" en las posiciones 57-58), que no aparece en ningún otro subtipo de DR5 ó DR6 y sí, en cambio, en un subtipo de DR4 y DR8, como se muestra en la Figura 30.

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CGG	ATC	CTT	CGT	GTC	CCC	ACA	GCA	CGT	TTC	TTG	GAG	TAC	TCT	ACG	TCT	GAG	TGT	
primer GH46									R	F	L	E	Y	S	T	S	E	C
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
CAT	TTC	TTC	AAT	GGG	ACG	GAG	CGG	GTG	CGG	TTC	CTG	GAC	AGA	TAC	TTC	TAT	AAC	
H	F	F	N	G	T	E	R	V	R	F	L	D	R	Y	F	Y	N	
34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	
CAA	GAG	GAG	TAC	GTG	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	GAG	TAC	CGG	GCG	GTG	ACG	
Q	E	E	Y	V	R	F	D	S	D	V	G	E	Y	R	A	V	T	
52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	
GAG	CTG	GGG	CGG	CCT	AGC	GCC	GAG	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC	ATC	CTG	GAA	
E	L	G	R	P	S	A	E	Y	W	N	S	Q	K	D	I	L	E	
70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	
GAC	AAG	CGG	GCC	GCG	GTG	GAC	ACC	TAC	TGC	AGA	CAC	AAC	TAC	GGG	GTT	GGG	GAG	
D	K	R	A	A	V	D	T	Y	C	R	H	N	Y	primer GH50				

Figura 29. Secuencia de nucleótidos del exón 2 del alelo HLA-DR13b deducida a partir de 5 individuos heterocigotos.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
DRB1*0101	GDTRPRFLEY	STSECHFNG	TERVRFIDRY	FYNQEEYVRF	DSDVGEFRAV	TELGRPDDEY	WNSQKDFLED	RRAAVDTYCR	HNIGVGESFT
DRB1*1102	---	---	---	---	---	---	I---	E---	V---
DRB1*1103	---	---	---	---	---	---	---	E---	V---
DRB1*1104	---	---	---	---	---	---	---	---	V---
DRB1*1201	---	G-Y	L-E-H	H-IL	---	VA-S	I---	---	AV---
DRB1*1301	---	---	---	H-N	---	A---	I---	E---	V---
DRB1*1302	---	---	---	H-N	---	A---	I---	E---	---
DRB1*1401	---	---	E-	H-N	Y-	A-	L-Q	---	---
DRB1*1402	---	---	---	H-F	Y-	AA-H	L-R	E-	V-
DRB1*13b	---	---	---	---	Y-	SA-	I-	K-	---
DRB1*0405	Q VKH	---	---	H-	Y-	SA-	L-Q	---	---
DRB1*0801	---	G-Y	---	---	Y-	SA-	---	L-	---

Figura 30. Comparación de la secuencia de HLA-DRB13b con las secuencias de otros alelos del grupo de DR52

2. Análisis de secuencias del exón 2 de los diferentes genes HLA-DRB

2.1 Obtención de 29 secuencias de DNA del exón 2 de los diferentes loci HLA-DRB

La amplificación genérica del exón 2 de los genes DRB de células homocigotas de tipaje (Tabla 6) e individuos no emparentados (Tabla 4), clonación de los productos amplificados y secuenciación de los clones recombinantes, nos permitió analizar alelos de cualquiera de los loci que contienen exón 2 (genes DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 y pseudogen DRB7), puesto que se utilizaron como primers de amplificación GH46 y GH50, que deben amplificar todos los genes DRB (Scharf y col., 1989).

La comparación de los 315 clones obtenidos, entre sí y con otras secuencias publicadas, nos permitió detectar 29 secuencias diferentes (alelos) como se muestra en la figura 31. Las secuencias que se han obtenido en este trabajo se marcan con un asterisco, en tanto que las no marcadas se han recogido de la bibliografía (Marsh y Bodmer, 1991) para completar la figura 31.

De las 29 secuencias alélicas, 27 se correspondían con especificidades previamente secuenciadas (incluida la secuencia DRB1*1303, correspondiente a la variable de RFLP DR13b). Sin embargo, las 2 secuencias restantes (denominadas en la figura X53357 y X53358, que corresponden al número de acceso registrado en el banco de datos europeo EMBL) presentaban bastantes sustituciones al compararlas con el resto de los alelos, y eran bastante homólogas entre sí.

	Dw	10	20	30	40	50	60	70
DRB1*0101	■ Dw1	TTTCTTG	GGCAGCTT	AAGTTT	GAATGTC	ATTCTT	CAATGGG	ACGGAGCGGGTGC
DRB1*0102	■ Dw20	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*0103	■ "BON"	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*1501	■ Dw2	---C---	---C---	AGG-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1502	■ Dw12	---C---	---C---	AGG-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1601	Dw21	---C---	---C---	AGG-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1602	■ Dw22	---C---	---C---	AGG-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*0301	■ Dw3	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	AC---C---	A---
DRB1*0302	"RSH"	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---G---	A---
DRB1*0401	■ Dw4	-----	GA---G---	ACA-G	-----C---	-----	C---C---	A---
DRB1*0402	Dw10	-----	GA---G---	ACA-G	-----C---	-----	C---C---	A---
DRB1*0403	Dw13a	-----	GA---G---	ACA-G	-----C---	-----	C---C---	A---
DRB1*0404	Dw14a	-----	GA---G---	ACA-G	-----C---	-----	C---C---	A---
DRB1*0405	Dw15	-----	GA---G---	ACA-G	-----C---	-----	C---C---	A---
DRB1*0406	"KT2"	-----	GA---G---	ACA-G	-----C---	-----	C---C---	A---
DRB1*1101	■ Dw5	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1102	"JVM"	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1103	---	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1104	"FS"	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*11e	---	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1201	■ "DB6"	-----	GA-T-CTC	-C-GG-G--T	-----	-----	A---G---	CA---
DRB1*1202	---	-----	GA-T-CTC	-C-GG-G--T	-----	-----	A---G---	CA---
DRB1*1301	■ Dw18	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1302	Dw19	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1303	■ "HAG"	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1401	■ Dw9	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*1402	■ Dw16	-----	GA-T-CTC	-C-C-G	-----	-----	C---G---	A---
DRB1*0701	■ Dw17	---C---	---GG---	A-A-G	-----C---	-----A	C---CT-	---
DRB1*0702	"DB1"	---C---	---GG---	A-A-G	-----C---	-----A	C---CT-	---
DRB1*0801	■ Dw8.1	-----	GA-T-CTC	-C-GG-G--T	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*0802	Dw8.2	-----	GA-T-CTC	-C-GG-G--T	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*0803	■ Dw8.3	-----	GA-T-CTC	-C-GG-G--T	-----	-----	C---C---	A---
DRB1*0901	■ Dw23	-----	AA---GA---	G-----C	-----	-----	AT---C-C-	G---
DRB1*1001	---	-----	GA-G-G---	G-----C	-----	-----	-----C	---
DRB2*0201	■ ---	-----	GA---GC---	C-G-----	()	-----	AC---T---	A---
DRB3*0101	■ Dw24	-----	GA---T---	G---C-G	-----	-----	AC---C---	A---
DRB3*0201	■ Dw25	-----	GA---T---	G---C-G	-----	-----	C---G---	CA---
DRB3*0202	■ Dw25	-----	GA---T---	G---C-G	-----	-----	C---G---	CA---
DRB3*0301	■ Dw26	-----	GA---T---	G---C-G	-----	-----	C---G---	A---
DRB4*0101	■	-----	GA---GC---	G-G-----	C-----	-----	A---T---AAC	ATC---A---
DRB5*0101	■ Dw2	-----	CA---GA---	A-G-----	C-----	-----	C---C-C-	GA---
DRB5*0102	■ Dw12	-----	CA---GA---	A-G-----	C-----	-----	C---C-C-	G---
DRB5*0201	Dw21	-----	CA---GA---	A-G-----	C-----	-----	C---C-C-	G---
DRB5*0202	■ Dw22	-----	CA---GA---	A-G-----	C-----	-----	C---C-C-	G---
X53357	■ ---	-----	GA---GC---	G-G-----	A-----	T-A-T---	A-AC---A-C-	A---
X53358	■ ---	-----	GA---GC---	G-G-----	A-----	T-A-T---	A-AC---A-C-	A---

Figura 31. Secuencias de nucleótidos del exón 2 de los diferentes alelos DRB conocidos

	Dw	80	90	100	110	120	130	140	150
DRB1*0101	■ Dw1	ATCTATAACCAAGAGGAGTCCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTGACGGAGCTGGGGC							
DRB1*0102	■ Dw20	-----							
DRB1*0103	■ "BON"	-----							
DRB1*1501	■ Dw2	T-----G-----T-----							
DRB1*1502	■ Dw12	T-----G-----T-----							
DRB1*1601	Dw21	T-----G-----							
DRB1*1602	■ Dw22	T-----G-----							
DRB1*0301	■ Dw3	T-C-----G-----AA-----T-----							
DRB1*0302	"RSH"	T-C-----G-----AA-----							
DRB1*0401	■ Dw4	T-----C-----A-----							
DRB1*0402	Dw10	T-----C-----A-----							
DRB1*0403	Dw13a	T-----C-----A-----							
DRB1*0404	Dw14a	T-----C-----A-----							
DRB1*0405	Dw15	T-----C-----A-----							
DRB1*0406	"KT2"	T-----C-----							
DRB1*1101	■ Dw5	T-----A-----T-----							
DRB1*1102	"JVM"	T-----A-----T-----							
DRB1*1103	---	T-----AA-----T-----							
DRB1*1104	"FS"	T-----A-----T-----							
DRB1*11e		T-----A-----T-----							
DRB1*1201	■ "DB6"	T-C-----G-----CT-C-----T-----							
DRB1*1202		T-C-----G-----CT-C-----T-----							
DRB1*1301	■ Dw18	T-C-----G-----AA-----T-----							
DRB1*1302	Dw19	T-C-----G-----AA-----T-----							
DRB1*1303	■ "HAG"	T-----A-----							
DRB1*1401	■ Dw9	T-C-----G-----T-----							
DRB1*1402	■ Dw16	T-C-----G-----AA-----							
DRB1*0701	■ Dw17	T-----G-----T-----A-----							
DRB1*0702	"DB1"	T-----G-----T-----A-----							
DRB1*0801	■ Dw8.1	T-----A-----							
DRB1*0802	Dw8.2	T-----A-----							
DRB1*0803	■ Dw8.3	T-----A-A-----							
DRB1*0901	■ Dw23	T-----AA-----							
DRB1*1001	---	G-C-----A-C-----A-----							
DRB2*0201	■ ---	T-----A-----A-----A-----T-----T-----							
DRB3*0101	■ Dw24	T-C-----G-----T-C-----							
DRB3*0201	■ Dw25	T-C-----G-----A-C-----G-----							
DRB3*0202	■ Dw25	T-C-----G-----A-C-----C-----G-----							
DRB3*0301	■ Dw26	T-C-----G-----T-----							
DRB4*0101	■	T-----A-C-----A-A-----T-C-----A-----							
DRB5*0101	■ Dw2	T-----GA-T-----							
DRB5*0102	■ Dw12	T-----AA-----							
DRB5*0201	Dw21	T-----AA-----							
DRB5*0202	■ Dw22	T-----AA-----G-----							
X53357	■ ---	T-----C-A-GG-----AA-C-----C-----A-----T-A-A-T-----A-----							
X53358	■ ---	T-----C-A-GG-----AA-C-----A-----A-----T-A-A-T-----A-----							

Figura 31. Secuencias de nucleótidos del exón 2 de los diferentes alelos DRB conocidos (cont.)

	Dw	160	170	180	190	200	210	220
DRB1*0101 ■ Dw1		GGCCTGATGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGAGGCCGGCCGCGGTGGACACCTAC						
DRB1*0102 ■ Dw20								
DRB1*0103 ■ "BON"					A	AG CGA		
DRB1*1501 ■ Dw2		C T			A	GC		
DRB1*1502 ■ Dw12		C T			A	GC		
DRB1*1601 Dw21		C T			T	AG C C		
DRB1*1602 ■ Dw22		C T				AG C C		
DRB1*0301 ■ Dw3						A G CG		A
DRB1*0302 "RSH"						A G CG		A
DRB1*0401 ■ Dw4						A		
DRB1*0402 Dw10					A	AG CGA		
DRB1*0403 Dw13a							A	
DRB1*0404 Dw14a								
DRB1*0405 Dw15		AGC						
DRB1*0406 "KT2"							A	
DRB1*1101 ■ Dw5		AG			T	AG C		
DRB1*1102 "JVM"		AG			T	AG C		
DRB1*1103 ---		AG			T	AG CGA		
DRB1*1104 "FS"		AG			T	AG CGA		
DRB1*11e		AG			A	AG CGA		
DRB1*1201 ■ "DB6"		TC C			A	AG C C		T
DRB1*1202		TC C			T	AG C C		T
DRB1*1301 ■ Dw18					A	AG CGA		
DRB1*1302 Dw19					A	AG CGA		
DRB1*1303 ■ "HAG"		AGC			A	AG C A		
DRB1*1401 ■ Dw9		C G C				G	A	T
DRB1*1402 ■ Dw16								
DRB1*0701 ■ Dw17		TC C			A	G C G CA		GTG
DRB1*0702 "DB1"		TC C			A	G C G CA		GTG
DRB1*0801 ■ Dw8.1		AGC			T	AG C CT		
DRB1*0802 Dw8.2					T	AG C CT		
DRB1*0803 ■ Dw8.3		AGC			A	AG C CT		
DRB1*0901 ■ Dw23		TC C				G A		GTG
DRB1*1001 ---						G T		
DRB2*0201 ■ ---		C T			A	A AA		A A
DRB3*0101 ■ Dw24		TC C				A G CG		AT
DRB3*0201 ■ Dw25						A G CA		AT
DRB3*0202 ■ Dw25						A G CA		AT
DRB3*0301 ■ Dw26		TC C				A G CA		AT
DRB4*0101 ■		C T				G A		
DRB5*0101 ■ Dw2		C T			T	AG C C		
DRB5*0102 ■ Dw12		C T			T	AG C C		
DRB5*0201 Dw21		C T			A	GC		
DRB5*0202 ■ Dw22		C T			A A	GC		
X53357 ■ ---		TCG A A			GAA	G AT A AA		
X53358 ■ ---		TCG A A			G A C G	A A AA A GA		

Figura 31. Secuencias de nucleótidos del exón 2 de los diferentes alelos DRB conocidos (final)

2.2 Descripción de dos nuevas variantes alélicas DRB

Las secuencias X53357 y X53358 se habían obtenido de las células BAC y RML, respectivamente. BAC es un individuo heterocigoto, y por exclusión del resto de las secuencias que se obtuvieron a partir de su DNA, se pudo asignar X53357 al cromosoma portador de la especificidad DR"Br", que es un subtipo de HLA-DR1. RML es una célula homocigota de tipaje con la especificidad DR2 y por lo tanto X53358 era una secuencia específica de haplotipos DR2.

La similitud entre ambas secuencias (8 variaciones de los 220 nucleótidos analizados) podía estar indicando que fueran 2 variantes de un mismo locus. Sin embargo, el gran número de sustituciones que presentaban frente al resto de las secuencias DRB conocidas (Figura 31) hacía pensar que pudieran pertenecer a otros loci de clase II (DPB, DQB).

2.3 Las nuevas variantes pertenecen a la familia de genes DRB

Para decidir su inclusión en la familia de clase II más adecuada, se realizó la comparación de estas secuencias con secuencias consenso de los diferentes loci de clase II conocidos: DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DRB7, DPB1, DPB2, DQB1 y DQB2. La comparación se realizó utilizando el programa CLUSTAL tanto para nucleótidos, como para la traducción a proteínas de las secuencias nucleotídicas. Cuando en algún loci se conocía la secuencia de más de 1 alelo, se obtuvo una secuencia "consenso" para dicho loci ("consenso"= en cada posición se coloca el nucleótido o aminoácido más representado de entre todas las variantes conocidas).

Los resultados de estas comparaciones se reflejan en la Tabla 9.

Tabla

Homología media entre el exón 2 (y dominio B1 teórico) de las nuevas secuencias y los exones 2 de otros genes de clase II (y sus dominios B1 deducidos)

GEN	HOMOLOGIA (%)	
	Proteína	DNA
DRB1	64.5	80.3
DRB7	63.6	82.8
DRB3	65.8	82.6
DRB4	65.8	82.8
DRB5	67.1	81.7
DPB1	59.5	75.0
DPB2	44.6	70.0
DQB1	52.7	75.0
DQB2	56.0	75.0

Se observa claramente que la homología de estas nuevas secuencias (al menos en su traducción a proteínas) es mucho mayor con las proteínas DR que con las proteínas DQ ó DP. Por lo tanto estas nuevas secuencias se asignan a la familia DRB y se propone como nombre para el nuevo loci DRB el de HLA-DRB6.

3. Estudio de la distribución y segregación del nuevo gen en los diferentes haplotipos HLA-DR

3.1 Distribución por haplotipos de las dos nuevas secuencias:

Para analizar la presencia de estas secuencias en los diferentes haplotipos (cromosomas) HLA-DR se diseñaron 3 oligonucleótidos basándonos en las concordancias o discrepancias entre estas secuencias (X53357 y X53358) y el resto de secuencias DRB conocidas:

DRB-600: nucleótidos 79-98; debería hibridar en las amplificaciones donde estuvieran presentes cualquiera de las dos nuevas secuencias y no debería hibridar con ninguna otra secuencia.

DRB-601: nucleótidos 199-217; seleccionado en la región de máxima disparidad entre X53357 y X53358, presenta identidad total con X53357 y 4 diferencias con X53358. Debería hibridar exclusivamente en presencia de X53357.

DRB-602: nucleótidos 199-217; extendiéndose en la misma zona que el nucleótido anterior. Debería hibridar exclusivamente en presencia de X53358.

En la figura 32 se muestra un resultado modelo de el oligo-tipaje realizado con estas tres sondas. Una vez analizadas todas las células homocigotas de tipaje (Tabla 7), individuos no emparentados (Tabla 5) y 2 familias de 4 individuos, se observa que

el oligonucleótido DRB-600 hibrida con los amplificados de todos los individuos DR1, DR2 y DR10, en tanto que el DRB-601 sólo hibrida con los DR1 y DR10 y el DRB-602 sólo hibrida con los DR2, como se resume en la Tabla 10.

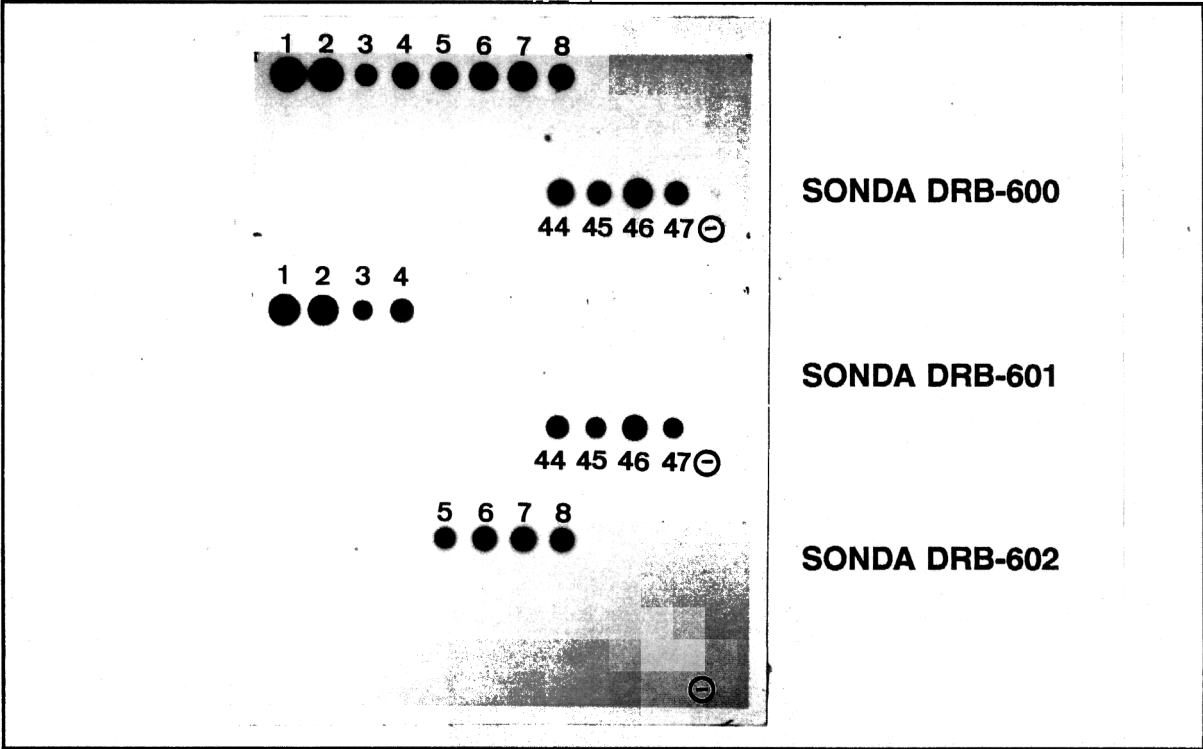


Figura 32. Patrones de oligo-tipaje del gen DRB6 en las células homocigotas analizadas

Tabla 10

Resumen de los resultados de Oligo-tipaje para la presencia de DRB6 en los diferentes haplotipos

Tipaje DR serológico	N	Positivos DRB-600 (%)	Positivos DRB-601 (%)	Positivos DRB-602 (%)	Negativos para las 3 (%)
1	19	100	100	0	0
2	19	100	0	100	0
10	15	100	100	0	0
otros	46	0	0	0	100

Estos resultados están, pues, a favor de la existencia del locus DRB6 en estos tres diferentes haplotipos: DR1, DR2 y DR10. También se confirma que existen al menos dos variantes alélicas de locus:

- X53357: presente en los haplotipos DR1 y DR10, y que de ahora en adelante denominaremos HLA-DRB6*0101
- X53358: presente en todos los haplotipos DR2, y que de ahora en adelante denominaremos HLA-DRB6*0201

3.2 Segregación de las secuencias de DRB6 en familias

El hecho de que las dos secuencias sean excluyentes, es decir, que en un cromosoma se encuentra una o la otra, pero nunca las dos juntas, y la segregación observada en dos familias (Tabla 11) junto a los alelos DR1 y DR2, respectivamente, demuestra que son dos alelos de un mismo locus. Sin embargo, la demostración definitiva es que al estudiar el sistema en 6 células homocigotas y 33 individuos no relacionados y hacer los cálculos para un equilibrio de Hardy-Weinberg, se observa que los valores de frecuencia esperados para ambos alelos coinciden exactamente con los valores observados. Los alelos HLA-DRB6*0101 y *0201 constituyen un sistema dialélico en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que no excluye que haya más alelos (principalmente por subdivisión de alguno de estos dos).

Tabla 11

Familias analizadas para la segregación de alelos DRB6 por técnicas de oligo-tipaje.

Nº	Individuo	HLA-DR serología	HLA-DR RFLPs	Oligos		
				600	601	602
87	578 padre	1,4,53	1,4	+	+	-
88	579 madre	5,6,52	11,13a1	-	-	-
89	580 hija	1,6,52	1,13a1	+	+	-
90	581 hija	1,6,52	1,13a1	+	+	-
91	582 hija	1,6,52	1,13a1	+	+	-
92	097 hijo	3,x,52	17.2,17.2	-	-	-
93	856 padre	3,4,52,53	17.2,4	-	-	-
94	857 hijo	3,4,52,53	17.2,4	-	-	-
95	858 hija	2,3,52	15,17.2	+	-	+
96	859 madre	2,3,52	15,17.2	+	-	+

4. Estudios de expresión del gen HLA-DRB6

4.1 Estudios indirectos: amplificación genérica de genes DRB y oligotipaje locus-específico.

El primer intento que se realizó para estudiar la expresión del nuevo locus DRB6, consistió en amplificar de modo genérico el RNA mensajero para todos los loci DRB. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos DRB-500 y DRB-300 que hibridan, respectivamente, con los exones 5'UT y 3'UT. Una vez sintetizada la primera hebra de cDNA a partir del RNA citoplásmico total, se sometía a PCR y un 10% del producto se corría en geles de agarosa al 2%.

El resultado característico de esta amplificación se muestra en la figura 33. La banda mayoritaria corresponde al amplificado del transcrito completo para HLA-DR, y todas las células son positivas para la amplificación, puesto que todas expresan alguno (o varios) genes DRB. Los amplificados se sometieron posteriormente a oligotipaje con los oligonucleótidos DRB-600, DRB-601 y DRB-602 para ver la presencia de transcritos específicos de DRB6, pero en todos los experimentos el resultado fue negativo.

La explicación más sencilla para este resultado negativo, es que el gen DRB6 haya variado mucho en su secuencia de la región 5'UT ó 3'UT, o en ambas, con respecto al resto de los genes DRB y por lo tanto, los oligonucleótidos empleados no fueran capaces de amplificar sus transcritos. Este resultado es posible, si se tiene en cuenta que el exón 2 de los alelos DRB6 difiere bastante de los otros alelos DRB, y se sabe que las regiones 5'UT y 3'UT, no están sometidas a selección natural (por no traducirse a proteínas), por lo que pueden acumular mutaciones.

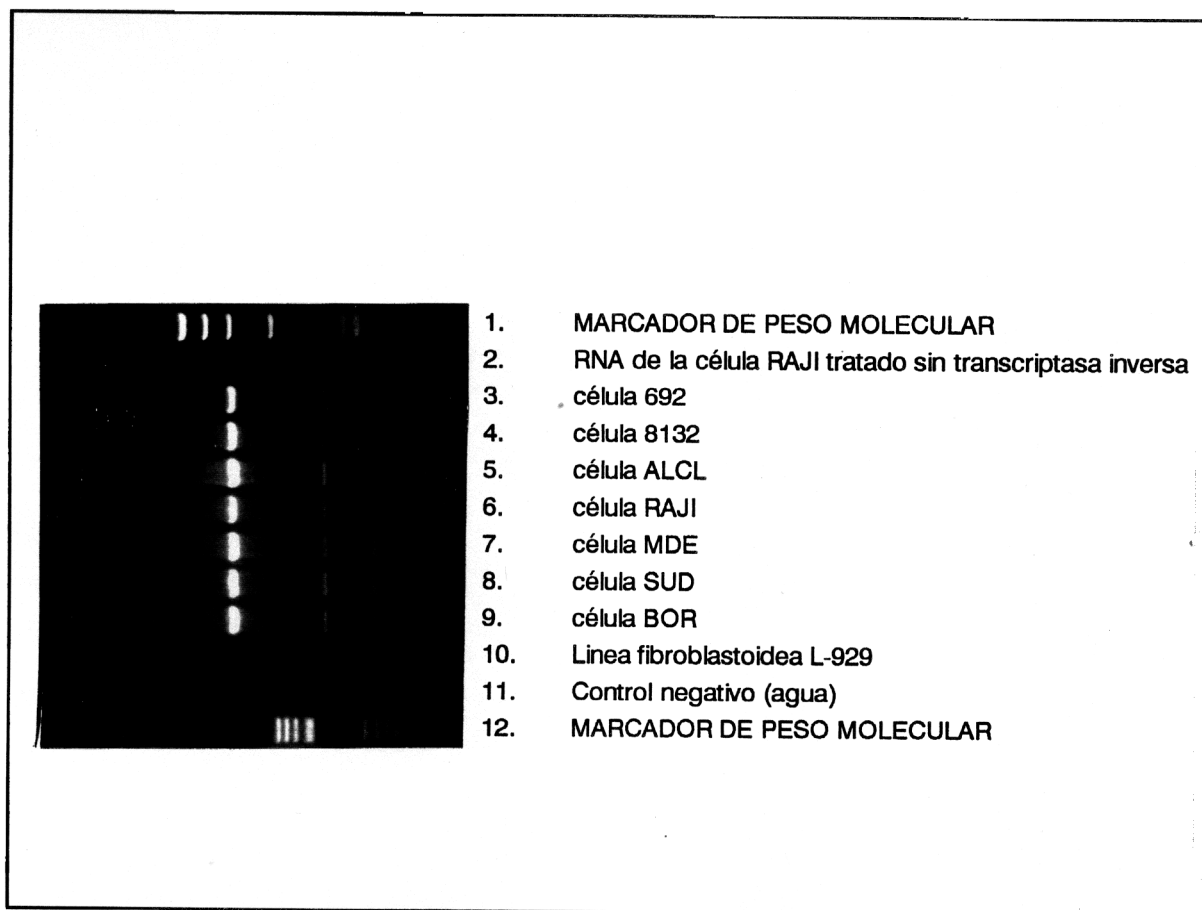


Figura 33. Amplificación genérica de los transcritos completos de los genes HLA-DRB

4.2 Estudios directos: amplificación específica de transcritos DRB6

Para obviar estos problemas, se realizó una amplificación a partir de cDNA con dos parejas de primers:

DRB-500 y DRB-600c

DRB-600 y DRB-300

en las que un primer (DRB-600 y DRB-600c) es específico para DRB6 y el otro es genérico. Los resultados de estas amplificaciones fueron siempre negativos para todas las células empleadas, lo que nos indica 2 cosas:

-que los primers DRB-600 son los suficientemente específicos para DRB6

-que tanto la región 5'UT como la 3'UT del gen DRB6 deben ser muy diferentes de las del resto de los genes DRB conocidos, o simplemente que el gen DRB6 no se está expresando y es un pseudogen.

Por tanto, la única amplificación posible específica de DRB6, se obtenía utilizando primers de la región cuya secuencia conocemos: DRB-600 y GH50. Sin embargo, y debido al hecho de que los dos primers se localizan dentro del mismo exón (exón 2), y que la presencia de trazas de DNA en la preparación de RNA, esta amplificación puede conducir a obtener falsos positivos.

Para resolver el problema de la posible contaminación de DNA, se realizó un ensayo en paralelo con la célula RAJI (DR3, DR10, y por tanto DRB6 positiva), llevando a cabo una síntesis ficticia de cDNA con todos los componentes de la reacción exceptuando la transcriptasa inversa. De este modo, si se produce amplificación tras la PCR, será debido a la presencia de DNA contaminante. El resultado de estas amplificaciones se muestra en la figura 34, donde se observa que sólo aquellas células DR1, DR2 ó DR10 (DRB6 positivas) amplifican con esta combinación de primers. Esto es una indicación de que el gen DRB6 produce, al menos, transcritos parciales.

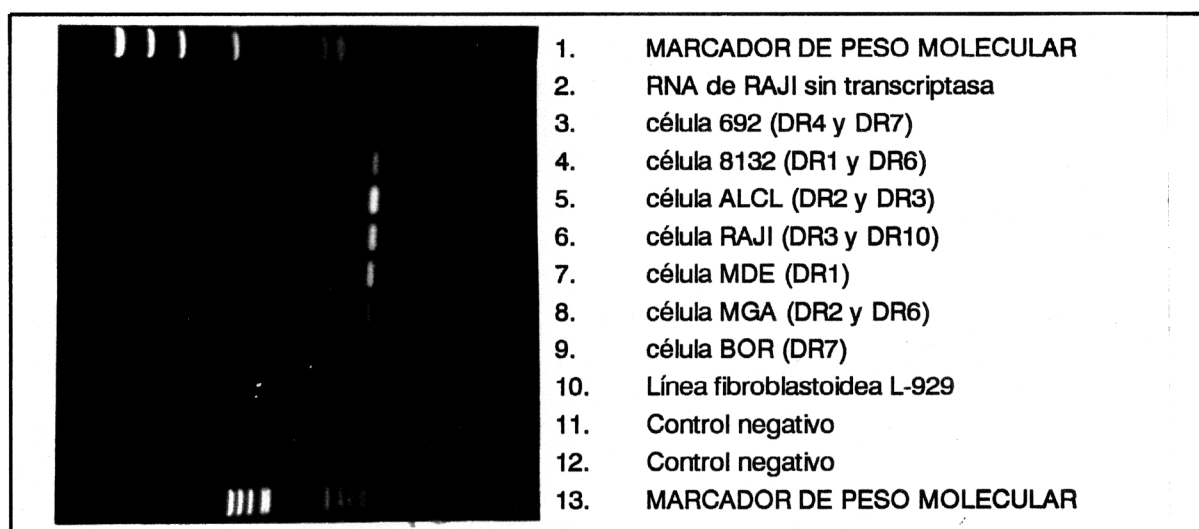


Figura 34. Amplificación específica de transcritos de DRB6 utilizando primers internos al exón 2.

5. Determinación de la estructura secundaria de la hipotética proteína DRB6

Aunque queda por obtener una evidencia definitiva de la expresión del gen DRB6, se puede estudiar su hipotético producto proteico y ver si se comporta como el del resto de las proteínas DRB. Con el programa de análisis de secuencias PC-GENE se puede traducir una secuencia de nucleótidos a su hipotética proteína correspondiente, y con la secuencia primaria se puede predecir la estructura secundaria de la proteína, por comparación entre su secuencia primaria y la estructura secundaria de proteínas conocidas cristalográficamente.

De este modo, se realizó la predicción de estructura secundaria de los dos alelos del gen DRB6, así como de alelos de varios otros loci: DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5. La comparación de estas predicciones se muestra en la figura 35. Los hallazgos más relevantes de esta comparación son:

- 1 Los dominios $\beta 1$ hipotéticos de las proteínas DRB6 han perdido la conformación de giro beta entre los residuos 17 a 20.
- 2 Los productos hipotéticos del gen DRB6 tienen una conformación en alfa-hélice más larga (entre los residuos 40 y 55), lo que ocasiona una pérdida de conformación en lámina beta extendida entre los residuos 50 y 54.
- 3 La presencia de una alfa hélice larga entre los residuos 57 y 76 de los productos proteicos de los otros genes, se ha perdido entre los residuos 64 y 71 del producto proteico de DRB6.
- 4 Además, el residuo 22, que es arginina en todas las proteínas DRB, está sustituido en la secuencia de la proteína DRB6; por tanto, se ha perdido un sitio potencial de glicosilación.

Como conclusión de los estudios de predicción de estructura secundaria, se podría

deducir, que de existir la proteína DRB6, sería muy diferente de las otras proteínas DRB conocidas.

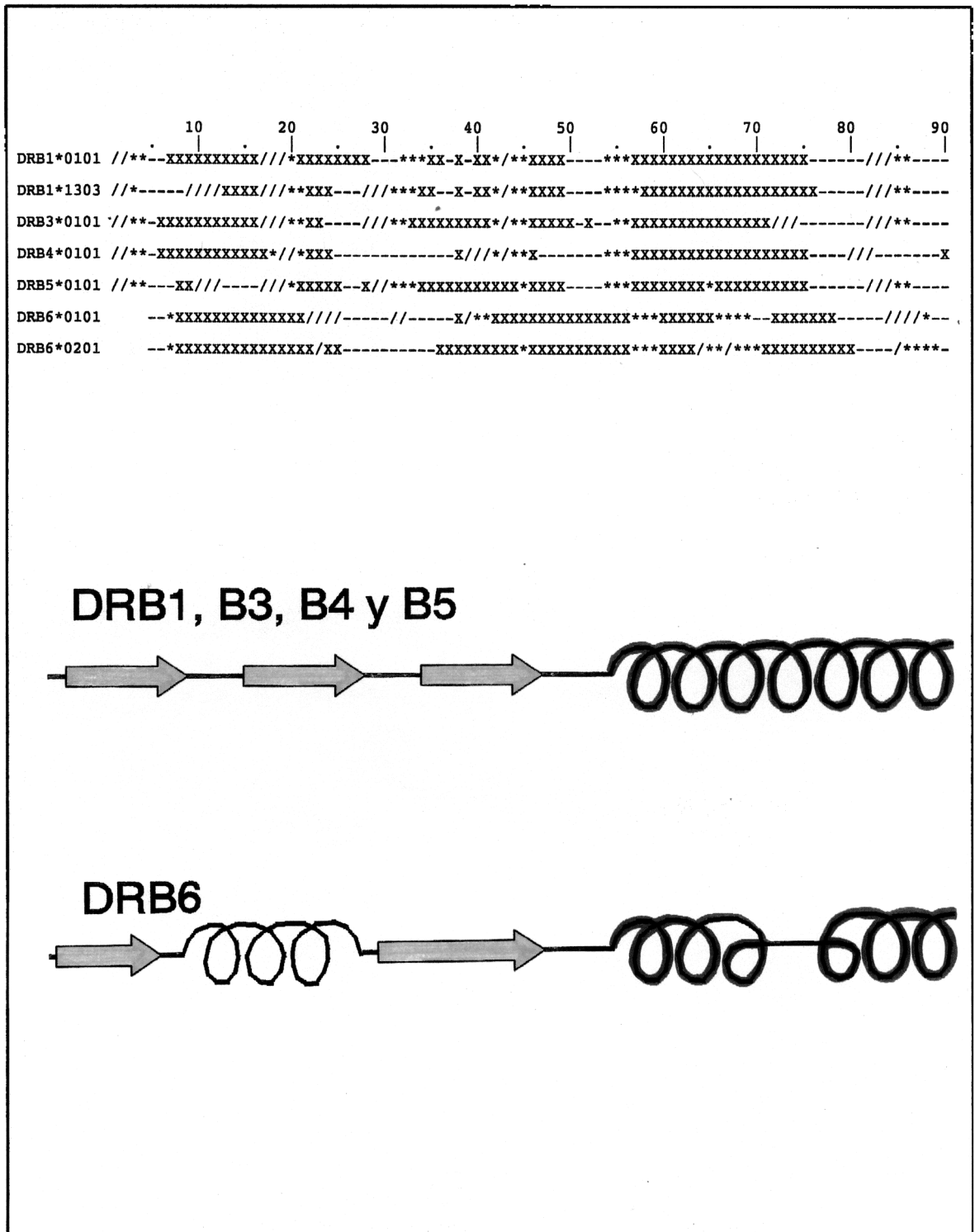


Figura 35. Comparación de la estructura secundaria del dominio $\beta 1$ de las diferentes proteínas HLA-DR

6. La caracterización del gen DRB6 aporta datos muy importantes en los estudios evolutivos de la región HLA-DR

6.1 Situación evolutiva del gen DRB6 dentro de la familia de genes DRB

Con los datos de homología de secuencia calculados anteriormente (Tabla 9) entre las diferentes secuencias consenso de nucleótidos de los genes DRB y la secuencia consenso de los dos alelos conocidos de DRB6, se puede construir un árbol o dendrograma filogenético para todos los diferentes genes de la familia. Este árbol se construye con el programa de ordenador CLUSTAL (ver materiales y métodos) que se basa, únicamente, en datos de homología.

El resultado más significativo que se observa en el árbol filogenético obtenido (Figura 36) es el hecho de que el gen DRB6 es, aparentemente, el más antiguo de todos los genes DRB conocidos, incluso más que el gen DRB1, que por ser el más polimórfico de todos se debería haber originado el primero. Este hecho podría indicar que la secuencia de los alelos DRB6 sea la más parecida a la del gen DRB ancestral, que posteriormente se diversificó por diferentes mecanismos moleculares (inserción, delección, duplicación, mutaciones puntuales o conversiones génicas).

6.2 Evolución de los diferentes haplotipos HLA-DR: grupos evolutivos

Si se realiza la comparación de todas las secuencias nucleotídicas entre sí, en lugar de comparar solamente las secuencias consenso, el árbol filogenético que se

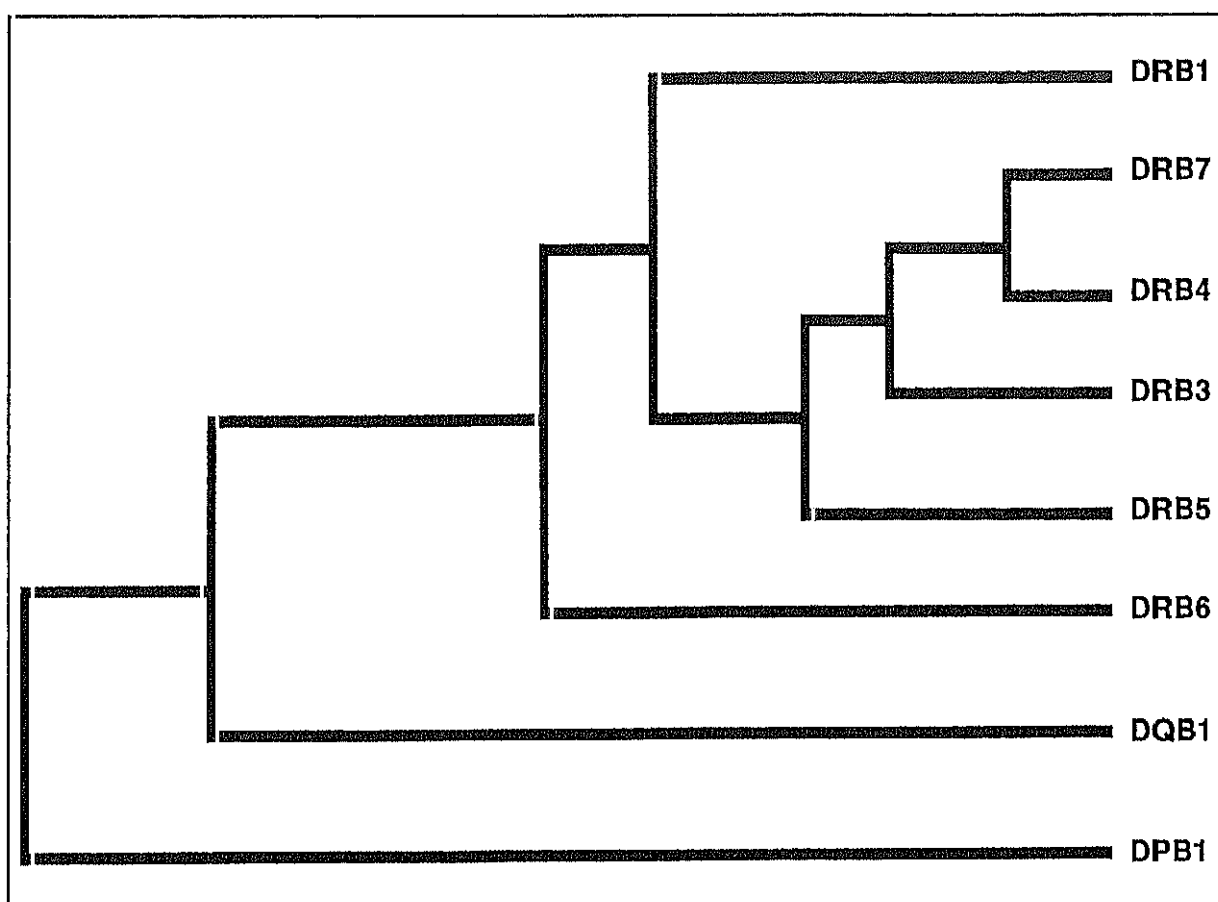


Figura 36. Arbol filogenético de los diferentes genes de la familia HLA-DRB

obtiene es bastante más complejo, pues tiene más de 40 ramas diferentes. Además, éste árbol no sería real, porque los genes no evolucionan sólo en su cromosoma, sino que evolucionan en bloque (Klein y col., 1989). Hay que tener en cuenta, por lo tanto, los mecanismos de duplicación o deleción que se hayan producido, y que han ido generando diferentes haplotipos (cromosomas) con diferente número de genes.

En la figura 37 se muestra un mecanismo de recombinación desigual entre dos cromosomas, cada uno de ellos con 2 genes DRB, que puede originar 2 nuevos cromosomas: uno con un gen DRB y el otro con 3 genes DRB. Se ha descrito la posibilidad de estas "duplicaciones" (Rollini y col., 1985) en algunos cromosomas.

También hay datos experimentales que sugieren que los haplotipos DR8 se han originado por una deleción (Gorski, 1989b). Aunque obtener pruebas formales de estas

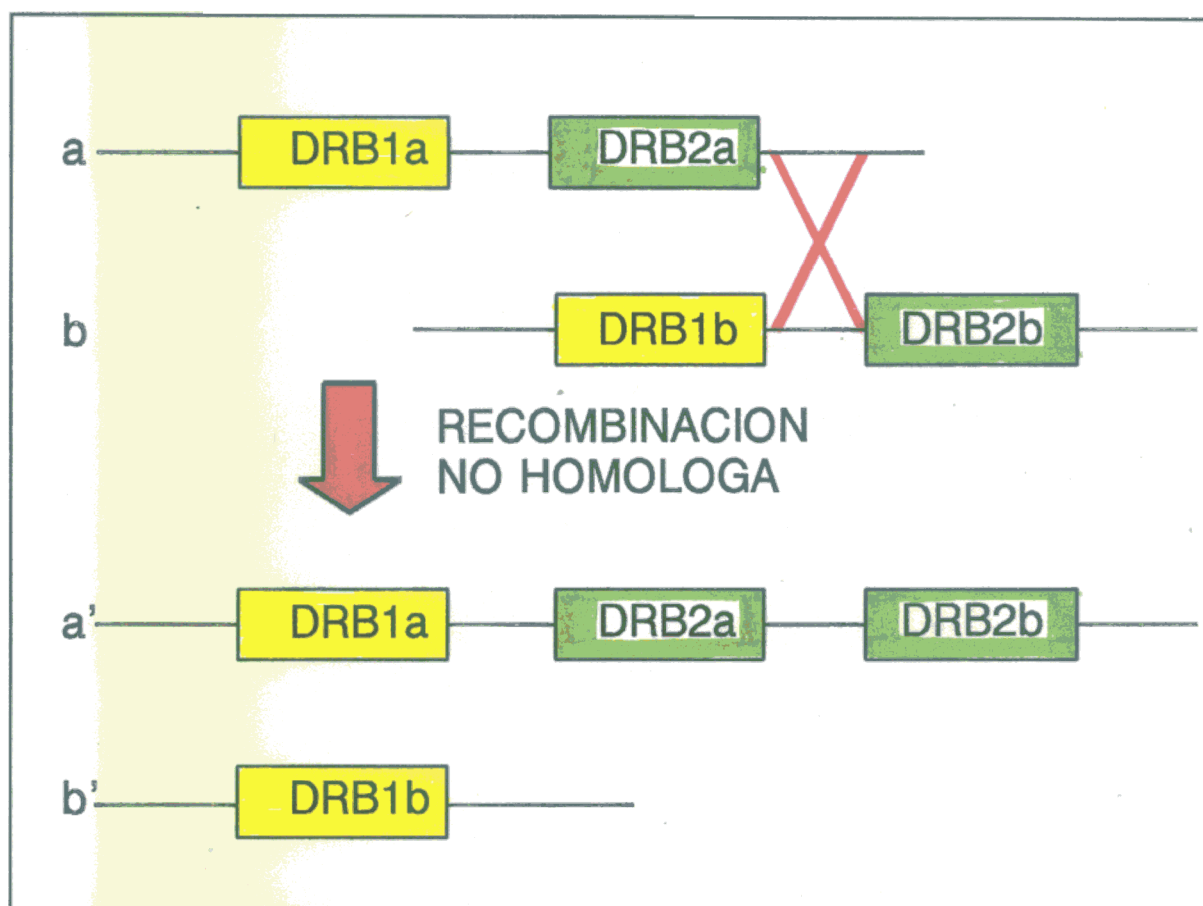


Figura 37. Mecanismos de recombinación no homóloga que generan haplotipos con diferentes dosis de genes HLA-DRB

deleciones o duplicaciones es muy difícil, su existencia podría explicar las diferentes dosis de genes en los distintos haplotipos.

Teniendo en cuenta los mecanismos postulados, el árbol filogenético obtenido para los genes DRB (Figura 36) y la comparación entre los 50 alelos diferentes conocidos (Figura 31), se puede proponer un árbol evolutivo para los haplotipos, como se muestra en la figura 38.

Lo más relevante de este árbol evolutivo, es que se pueden distinguir 3 ramas o grupos evolutivos:

- 1 El grupo del DR52, o haplotipos portadores del gen DRB3. Además de ser un grupo de reacción cruzada, comparten en su estructura el tener 3 loci DRB:

MECANISMOS GENETICOS:

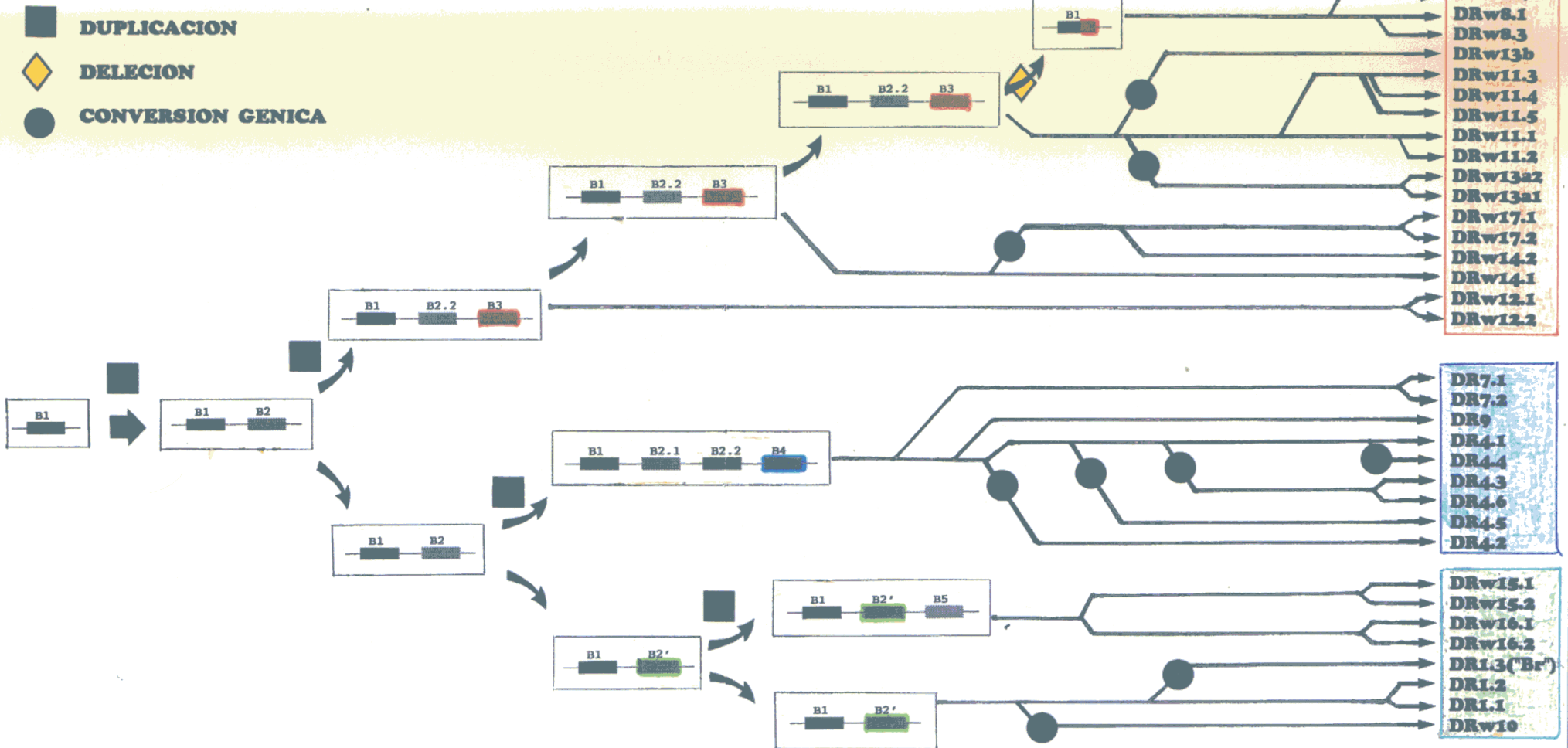


Figura 38. Arbol filogenético propuesto para la evolución de los diferentes haplotipos HLA-DR.

- DRB1, DRB2 y DRB3. Incluye aquellos haplotipos (cromosomas) que codifican para los antígenos HLA-DR3, DR5 y DR6. Además, se incluyen en este grupo los haplotipos DR8, que aunque sólo tienen un gen DRB (híbrido DRB1-DRB3) se han originado por delección de un haplotipo DR52 completo (Gorski, 1989b).
- 2 El grupo del DR53, o haplotipos portadores del gen DRB4, que también es un grupo de reacción cruzada. Incluye los haplotipos (cromosomas) que codifican para los antígenos DR4, DR7 y DR9. Tienen en común, el contener 4 loci DRB: DRB1, DRB7, DRB8 y DRB4, donde DRB1 y DRB4 son activos, y los otros 2 son pseudogenes.
 - 3 El grupo de DR1, DR2 y DR10, o haplotipos portadores del gen DRB6, que llamaremos, por similitud con los anteriores, grupo del DR54, aunque en este caso no constituyen un grupo de reacción cruzada. Hay 2 tipos de haplotipos: los DR1 y DR10, con sólo dos genes DRB (DRB1 y DRB6) y los DR2, con 3 genes DRB (DRB1, DRB6, DRB5).

7. Variabilidad de dosis génica: situación de DRB6 en los haplotipos DR1, DR2 y DR10

Con la descripción del gen DRB6, el número de bandas RFLP que se obtienen en los diferentes haplotipos, coincide exactamente con el número de loci DRB que tiene cada uno de ellos:

1 RFLP	DR8
2 RFLPs	DR1 y DR10
3 RFLPs	DR2, DR3, DR5 y DR6
4 RFLPs	DR4, DR7 y DR9

y los correspondientes subtipos de cada uno de estos tipos principales.

En la figura 39, se muestra la constitución hipotética de los diferentes haplotipos DRB. La situación de DRB6 es hipotética, pero en el caso de los haplotipos DR2 se sabe que se sitúa entre los genes DRB1 y DRB5 (Kawai y col., 1990), pues ya se conocía la existencia de un gen adicional en la región, que corresponde a HLA-DRB6.

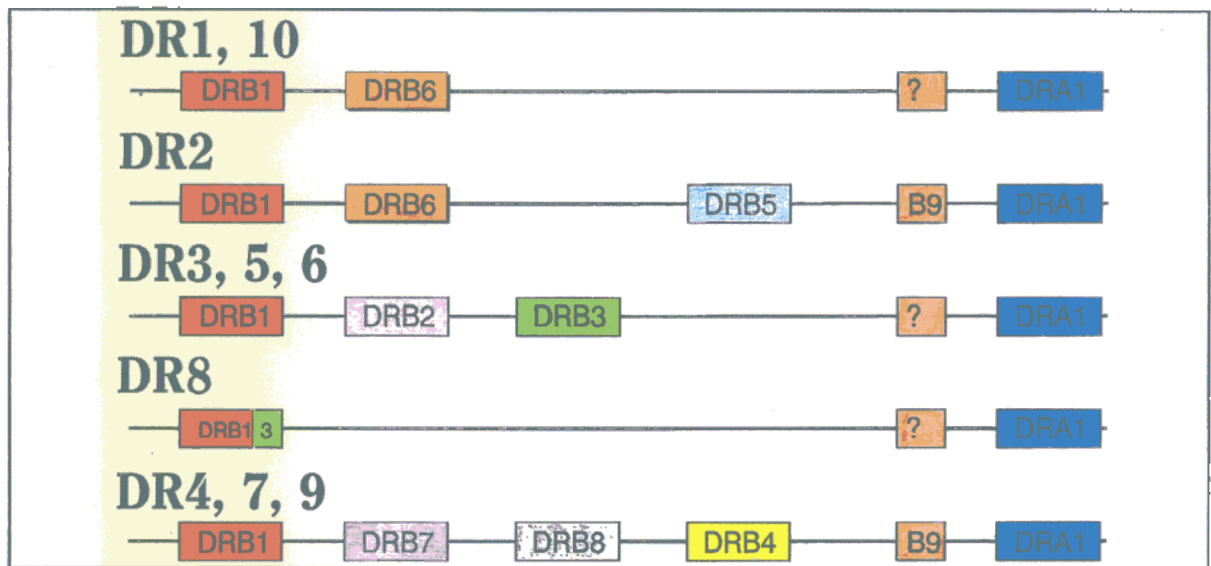


Figura 39. Estructura de la región en los diferentes tipos de haplotipos HLA-DR: dosis diferencial de genes DRB.

8. Obtención de secuencias más largas del exón 2 del gen HLA-DRB6

8.1 Descripción de un tercer alelo del locus DRB6

Con la utilización de nuevos primers, capaces de amplificar una región mayor del exón 2 de los diferentes loci HLA-DRB:

-DRBampA y DRBampB

-ó DRBampA y DRB-6I25 (éste último es del intrón 2)

se detectó un nuevo polimorfismo en la región 3' terminal del exón 2. En la figura 40 se puede observar una única sustitución en la posición primera del codón 84: "A" ó "G", que aparecía de modo excluyente en las secuencias DRB6 de los individuos DR2. Las secuencias con "G" en dicha posición se siguieron denominando HLA-DRB6*0201, en tanto que las secuencias con una "A" se denominaron HLA-DRB6*0202.

Para determinar si esta subdivisión de alelos correlacionaba con los subtipos serológicos del DR2 (DR15 y DR16) se secuenció el exón 2 del gen DRB6 de 14 individuos tipificados para HLA-DR por serología y RFLPs (Tabla) y se encontró una correlación absoluta entre el subtipo de DR2 y el subtipo de DRB6 que presentaban cada uno de los cromosomas estudiados:

-Los cromosomas DR15, siempre iban acompañados de HLA-DRB6*0201

-Los cromosomas DR16, presentaban siempre el subtipo HLA-DRB6*0202

Tabla 12

Fenotipo HLA-DR serológico y RFLP de individuos DR2, y alelos de DRB6 asociados en cada caso.

Individuo	HLA-DR		Secuencias DRB6 obtenidas
	Serol.	RFLPs	
9325	2,6,52	13a3,16	*0202
9136	2,x	15,15	*0201
9227	2,7,53	7.1,16	*0202
9285	2,6,52	13a1,15	*0201
9150	2,9,53	9,15	*0201
8987	2,7,53	7.1,15	*0201
9266	2,5,52	11,15	*0201
9097	1,2	1,15	*0201
8133	1,2	1,15	*0201
9326	2,6,52	14a,15	*0201
8836	1,2	1,15	*0201
8730	2,7,53	7.1,15	*0201
9187	2,7,53	7.1,15	*0201
9137	2,6,52	14a,16a	*0202

Se observa, que de los 14 individuos estudiados, los 11 con el subtipo DR15 tienen el alelo DRB6*0201, en tanto que los 3 restantes, que son DR16, llevan el alelo DRB6*0202.

No cabe descartar la posibilidad de un mayor grado de variabilidad del gen HLA-DRB6, puesto que aún falta por secuenciar sus exones 3 y 4, que en otros loci, presentan polimorfismo (aunque en menor grado que el exón 2).

HLA-DRB6*0101 *0201 *0202	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	CCC	ACA	GCA	CGT	TTC	TTG	GAG	CAG	GCT	AAG	TGT	GAG	TGT	CAT	ATC	TTC	AAT	GGG	ATG	AAG	CGG	GTG
	***	***	***	**	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HLA-DRB6*0101 *0201 *0202	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
	CAG	TAC	CTG	AAC	AGA	TAC	ATC	CAT	AAA	CGG	GAG	GAG	AAC	CTG	CCC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GAG	GAG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G-	---	---	---	A--	---	---	---
HLA-DRB6*0101 *0201 *0202	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
	TTC	CAG	GCA	GTT	ACG	GAA	CTG	GGG	CGG	CCT	GTC	GCA	GAG	AAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GGA	ATC	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C-	---	-C-
HLA-DRB6*0101 *0201 *0202	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
	GAG	GAG	AAT	CGG	GAC	AAG	GTG	GAC	ACC	TAC	TGC	AGA	TAC	AGT	TAC	GGG	GTT	TTT	GAG	AGC	TTC	ACA
	---	---	-G-	---	---	---	A--	---	GA-	---	---	---	---	-A-	---	---	-T-	---	---	-C-	---	-C-
HLA-DRB6*0101 *0201 *0202	91	92	93	94																		
	GTG	CAG	CCG	TGA	G	gtgaacgcgg	cggggggctg	ggcctgagtc	cctgtgagct	ggg												
	---	---	---	---	---	---	---	-----	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Figura 40. Secuencia nucleotídica del exón 2 y comienzo del intrón 2 en los tres alelos caracterizados del locus HLA-DRB6.

8.2 Presencia de codones de terminación en el exon 2 de los diferentes alelos de HLA-DRB6

Al obtener secuencias más largas del exón 2, se puede observar que los tres alelos de HLA-DRB6 presentan codones de terminación, originados por diferentes mecanismos mutacionales como se puede observar en la figura 40:

- 1 En el alelo HLA-DRB6*0101, se produce una mutación puntual en el codón 94 (el último del exón) que produce un codon "TGA" de terminación de traducción.
- 2 En los alelos HLA-DRB6*0201 y *0202, se inserta una "T" entre los codones 85 y 86, lo que produce un cambio de pauta de lectura: el codón 86 sería "TTT" en tanto que el 87 sería "TGA" que es de nuevo una señal de interrupción de la traducción.

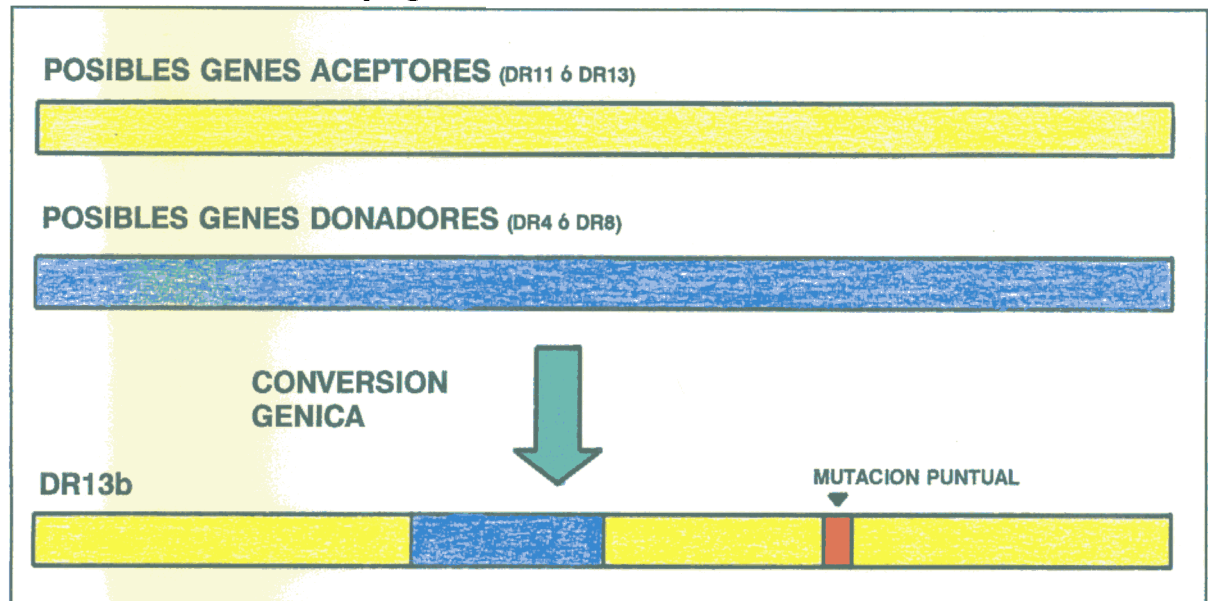
Este hallazgo es muy interesante, ya que por una parte, sería un dato a favor de que el locus DRB6 es un pseudogen, desde un punto de vista tradicional, por la aparición de codones de terminación en exones tempranos; y por otra parte, si aceptamos que se pueda expresar y traducir a proteínas, estas proteínas estarían tan severamente truncadas con respecto a las otras proteínas DR, que habría que pensar tuvieran algún otro tipo de función.



Discusión

1. El alelo HLA-DR13b se pudo haber originado por un mecanismo de conversión génica.

La comparación de la estructura del alelo HLA-DR13b con otros de su grupo de reacción cruzada (Grupo del DR52) sugiere que su aparición pudo haber tenido lugar por un mecanismo de conversión génica. Se ha llamado conversión génica al intercambio desigual de pequeñas porciones de material genético, donde hay un fragmento de DNA (o gen) "receptor" y otro "donante" (Gregersen y col., 1987). Los datos de esta comparación indican que DR13b se pudo originar bien a partir de DR11 (subtipo *1102), ó de DR13 (subtipo *1301 ó 1302) como receptores, y de DR4 (subtipo *0405) ó DR8 (subtipo *0801) como donantes. La donación implicó como mínimo la región comprendida entre los nucleótidos 109 y 207, y se refleja principalmente en los cambios de aminoácidos en las posiciones 56 y 57 ("SA"). En la figura 41 se propone esquemáticamente el mecanismo molecular que pudo dar origen a la aparición de este subtipo genético.



Además, la existencia en la posición 71 de una lisina ("K") en lugar del ácido glutámico ("E"), que es el residuo de todos los posibles aceptores, sugiere que ha debido de producirse

una mutación puntual no conservativa. Este hecho, unido a la sustitución que se observa en la posición 57 (Serina "S", en lugar de aspartato "D") pueden ser los hallazgos más relevantes de la secuencia de este exón, ya que pueden haber generado un cambio conformacional de la molécula e incluso conferir susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades. Se ha sugerido recientemente (Erich, 1989) que la presencia aminoácidos neutros diferentes a Aspartato en la posición 57 de la cadena β de las proteínas DR puede conferir susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes, y la serina es uno de estos aminoácidos neutros. Sería, por lo tanto, de gran interés, investigar la frecuencia del alelo HLA-DR13b en estas enfermedades, y compararla con la incidencia de los subtipos DR5 y el resto de los subtipos del alelo DR6.

2. El locus HLA-DRB6

2.1 Distribución por haplotipos

El hallazgo del locus DRB6 en los haplotipos (cromosomas) DR1, DR2 y DR10 se puede considerar de gran trascendencia por varios motivos:

1. Con la descripción del gen, el número de RFLPs que se obtienen en las diferentes células homocigotas de tipaje coincide exactamente con el número de genes ó pseudogenes HLA-DRB que se conocen en los diferentes haplotipos (Bidwell y Jarrold, 1986): 1 gen (DR8), 2 genes (DR1 y DR10), 3 genes (DR2, DR3, DR5 y DR6) ó 4 genes (DR4, DR7 y DR9).
2. Por lo tanto, es razonable pensar que este gen es el único que quedaba por identificar en la subregión HLA-DR.

2.2 Alelos del gen DRB6:

Se han encontrado hasta el momento 3 alelos del gen HLA-DRB6, con un patrón de distribución específico en los diferentes haplotipos donde este locus está presente:

DRB6*0101 se ha encontrado en todos los haplotipos DR1 y DR10 analizados

DRB6*0201 se ha encontrado en todos los haplotipos DR15 (subtipo de DR2)

DRB6*0202 se ha encontrado en todos los haplotipos DR16 (subtipo de DR2)

Esta distribución tan exacta parece indicar que el alelismo del locus se pueda haber originado paralelamente a la diferenciación de estos 4 haplotipos donde está presente. Se podría decir, que las variantes alélicas son contemporáneas a la diversificación de los haplotipos o, a lo sumo, posteriores. Si el alelismo de DRB6 fuese más antiguo que la separación de los haplotipos DR1 y DR2, por ejemplo, cabría esperar que hubiese en la actualidad haplotipos DR2 con el alelo DRB6*0101 ó haplotipos DR1 con el alelo DRB6*0201, y este no es el caso. Por otra parte, suponiendo que los 3 alelos provienen de una única secuencia ancestral, es lógico suponer que las mutaciones que han sufrido sean bastante antiguas, pues se han perpetuado en todos los haplotipos analizados.

3. HLA-DRB6: ¿Gen o Pseudogen?

3.1 Estudios de expresión

Los estudios de expresión del locus HLA-DRB6 no han resultado totalmente concluyentes, en el sentido de que la única transcripción que se ha podido detectar corresponde a una pequeña región del exón 2 y no al gen completo. De estos resultados, se pueden obtener, en cambio, algunas conclusiones importantes:

1. Los exones para las regiones 5'UT y 3'UT de HLA-DRB6 han de ser

muy diferentes a los de los restantes genes DRB; esto viene explicado por una ausencia de amplificación con oligonucleótidos específicos para estas regiones.

2. Además, si asumimos que HLA-DRB6 es el mismo gen que localizaron en los haplotipos DR2 (Kawai y col., 1989), hemos de aceptar que carece de exón 1, esto es, el exón que codifica para el péptido señal.
3. La amplificación específica de HLA-DRB6 a partir de cDNA, con los debidos controles que monitorizan la contaminación de DNA es positiva, lo que aparentemente significa una transcripción parcial del gen.

3.2 Predicción de estructura proteica

La comparación de la estructura secundaria del hipotético producto proteico del locus DRB6 sugiere que, si este gen se está expresando, la proteína para la que codifica va a ser bastante diferente del resto de las proteínas DR β conocidas:

1. Carece de sitios potenciales de glicosilación, por haber perdido el residuo Arginina en posición 22
2. La estructura en alfa-hélice entre los residuos 57 y 76, se rompe entre los residuos 61 y 71 del producto proteico de DRB6. Y esta alfa-hélice es muy importante como límite del bolsillo de presentación antigénica.

De todo ello se deduce, que si HLA-DRB6 es un gen y no un pseudogen, la proteína codificada va a tener una función diferente, ya que su estructura es radicalmente diferente a la del resto de las proteínas DR β conocidas.

3.3 Características nucleotídicas del exón 2 de HLA-DRB6

Además de los estudios específicos de expresión, o de lo que se puede teorizar

estudiando la estructura hipotética de la proteína HLA-DRB6, podemos comparar la secuencia primaria de nucleótidos, que es el dato más real del que disponemos. Esta comparación nos permite observar determinadas características que distinguen los diferentes genes HLA-DRB de los pseudogenes, como se observa en la Tabla 13.

Tabla 13

Características nucleotídicas del exón 2 de los genes HLA-DRB

Gen	Codones de terminación en el exón 2	Polimorfismo en el exón 2	Codones para metionina	Deleciones en el exón 2	Definición de grupo "supratípico"
DRB1	-	+	-	-	-
DRB2	*	*	*	+	-
DRB3	-	+	-	-	+
DRB4	-	+	-	-	+
DRB5	-	+	-	-	-
DRB6	+	+	+	-	+
DRB7	+	-	+	+	-
DRB8	*	*	*	+	-

* Aspectos no comparables debido a la ausencia parcial o total de exón 2 en estos genes

Si no existe producto de HLA-DRB6, su secuencia nucleotídica tiene unas características peculiares, que lo colocan en una situación intermedia entre el resto de los genes y pseudogenes HLA-DRB conocidos:

1. HLA-DRB6 contiene codones para residuos metionina, al igual que el pseudogen DRB7. Además, contiene codones de terminación dentro del exón 2: exactamente igual que DRB7 y a diferencia de los otros genes DRB.
2. A diferencia de los pseudogenes, HLA-DRB6 presenta polimorfismo de secuencia en el exón 2 (como DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5; todos los genes activos), carece de deleciones totales o parciales de nucleótidos del exón 2 (a diferencia de DRB2, DRB7 y DRB8, que son pseudogenes) y define un grupo "supratípico" de haplotipos: el de DR1, DR2 y DR10, que asemeja a lo que sucede con DRB3 (que agrupa a DR3, DR5 y

DR6) y lo que sucede con DRB4 (que agrupa a DR4, DR7 y DR9).

4. Situación evolutiva de HLA-DRB6 dentro de la familia de genes HLA-DRB

4.1 HLA-DRB6 es el gen más antiguo de la familia DRB

La comparación de la secuencia nucleotídica consenso del exón 2 de los diferentes alelos del locus HLA-DRB6 con las secuencias consenso del mismo exón del resto de los genes HLA-DRB, sitúa a este locus, DRB6, muy lejano en la evolución de esta familia de genes. Como se observa en la figura 36 este locus es incluso más antiguo que el locus DRB1, que es el más polimórfico de la familia. Esto significa, que HLA-DRB6 es el gen que primero se diversificó a partir del gen DRB ancestral (primordial). Y además, este hecho indica, que los haplotipos que poseen este locus genético (DR1, DR2 y DR10) son previsiblemente los más antiguos en la evolución de esta región del genoma HLA.

4.2 Evolución de los diferentes haplotipos HLA-DRB

Los genes, sean de la región o cromosoma que sean, no evolucionan en solitario (Klein y col., 1991). Tampoco el gen HLA-DRB6 ha evolucionado sólo, lo ha hecho inmerso en los haplotipos que lo portan: DR1, DR2 y DR10. Teniendo en cuenta el desequilibrio de ligamiento entre los genes, y que no se ha encontrado hasta la fecha la presencia del locus DRB6 en haplotipos diferentes de DR1, DR2 ó DR10, al igual que no se ha encontrado el gen DRB4 en haplotipos distintos a DR4, DR7 ó DR9; teniendo en cuenta, además, el diferente número de genes HLA-DRB que se encuentra en cada haplotipo, y teniendo, por último, en cuenta la antigüedad de los

diferentes genes DRB, se ha podido construir un árbol de evolución de haplotipos hipotético (Figura 38).

En este árbol, se pueden localizar 3 ramas claramente diferenciadas:

1. La rama DR52: incluye a todos aquellos haplotipos que portan el gen DRB3 (DR3, DR5 y DR6) y los haplotipos DR8. Esta rama ha sufrido una compleja sucesión de eventos genéticos: deleciones y duplicaciones consecutivas (Rollini y col., 1985) que llevan a su estructura actual con 3 genes: DRB1, DRB2 y DRB3. Un caso aparte es el de los haplotipos DR8, que sólo tienen un gén híbrido DRB1-DRB3, y se sabe que se originaron por deleción, probablemente a partir de un haplotipo DR5 (Gorski, 1989).
2. La rama DR53, incluye los 3 haplotipos que contienen el gen DRB4: DR4, DR7 y DR9. Esta rama evolutiva parece haber sufrido menos modificaciones y contener las 4 copias DRB originales: DRB1, DRB7, DRB8 y DRB4.
3. La rama DR"54", incluye los 3 haplotipos que contienen el gen DRB6: DR1, DR2 y DR10. Dentro de esta rama hay 2 grupos claramente diferentes: el grupo del DR2, con 3 genes DRB: DRB1, DRB6 y DRB5, y el grupo del DR1 que se debió originar posteriormente por pérdida del locus DRB5 y que aglutina a los haplotipos DR1 y DR10.

Con esta hipótesis, todas las piezas del rompecabezas evolutivo encajan adecuadamente. Se puede pensar, que si esta evolución no es estrictamente cierta, sí es bastante probable. Las pruebas experimentales de estos procesos de duplicaciones

/ deleciones son difíciles de encontrar. Deben buscarse bien en otras especies relacionadas con el hombre (como primates superiores), bien en restos fósiles de antecesores del *Homo sapiens* (como otras especies *Homo*, o incluso individuos del género *Australopithecus*).

Sin embargo, hay un dato importante que si se puede valorar: el gen DRB6 se encuentra directamente en los haplotipos DR1, DR2 y DR10. De modo indirecto, también se encuentra en los haplotipos DR4, DR7 y DR9, ya que la primera región hipervariable del gen DRB4 es idéntica a la del gen DRB6. Esta consideración apoya los datos obtenidos en cuanto a la edad del gen DRB6, aparentemente el más arcaico. ¿Qué ha sucedido con los haplotipos DR3, DR5, DR6 y DR8?. Podemos pensar en 2 explicaciones para argumentar la pérdida de este gen: Por una parte se ha postulado que los haplotipos del grupo DR52 han sufrido continuas deleciones y/o duplicaciones (figura 38) y en una de esas deleciones se pudo perder el gen (Corell y col., 1992); por otra parte, el pseudogen de estos haplotipos, DRB2, carece de exón 2, y también es posible que este exón delecionado contuviera una primera región hipervariable como la de DRB4 y DRB6. Ambas hipótesis son de difícil fundamentación experimental.

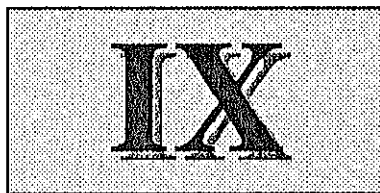


Conclusiones

1. Se ha caracterizado la secuencia nucleotídica del exón 2 del alelo HLA-DR13b definido por la técnica de RFLPs, y que es un subtipo del alelo serológico HLA-DR6.
2. La secuencia nucleotídica de HLA-DR13b sugiere que este alelo se ha podido originar por un mecanismo de conversión génica, bien a partir de otros subtipos HLA-DR13, bien a partir de alelos HLA-DR5.
3. Se ha caracterizado la presencia de un nuevo locus HLA-DRB, denominado HLA-DRB6, en todos aquellos haplotipos cuyo gen DRB1 codifica para las proteínas definidas serológicamente como HLA-DR1, -DR2 ó -DR10.
4. Este nuevo locus presenta al menos 3 variantes alélicas que se han denominado HLA-DRB6*0101, *0201 y *0202. Se ha encontrado un desequilibrio de ligamiento absoluto entre estas 3 variables alélicas y los haplotipos DR1 y DR10 (para *0101), DR15 (para *0201) y DR16 (para *0202).

5. Con el hallazgo de este nuevo locus, el número de genes DRB de cada haplotipo HLA coincide exactamente con el número de RFLPs que se obtienen cuando se utilizan sondas de cDNA específicas de exón (como pRTV1).
6. Los estudios comparativos de este locus, DRB6, con el resto de los loci HLA-DRB, sugieren que DRB6 es probablemente el gen más antiguo de la familia; es decir, el primero que se diversificó a partir del gen DRB ancestral.
7. La presencia del locus HLA-DRB6 en sólo algunos haplotipos, permite definir un nuevo grupo evolutivo "supratípico", que hemos denominado DR54 e incluye los haplotipos DR1, DR2 y DR10. DRB6 es un marcador de estos 3 diferentes haplotipos, tal como DRB3 es marcador del grupo DR52 (haplotipos DR3, DR5, DR6 y DR8) ó como DRB4 es marcador del grupo DR53 (haplotipos DR4, DR7 y DR9). Además, la mayor antigüedad del locus DRB6, indica que estos haplotipos (DR1, DR2 y DR10) son también, probablemente, los más antiguos.

8. Los estudios de expresión indican que en las células DR1, DR2 y DR10 hay transcritos, al menos parciales, del gen DRB6. No se han detectado transcritos completos, y de existir un producto proteico del locus, éste sería bastante diferente tanto estructural como funcionalmente, del resto de proteínas HLA-DR conocidas.



Bibliografía

A

- Abbal M., Moennarid C., Cambou-Thomsen A., Tkaczuk J., Ohayou E. y Mauff G.: A new Bf variant (BfS11) with information for orientation of MHC class III genes. *Immunogenetics* 26: 320-322, 1987
- Abe K., Wei J-F., Hsu Y-C., Uehara H., Artzt K. y Bennett D.: Searching for coding sequences in the mammalian genome: the H-2K region of the mouse MHC is replete with genes expressed in embryos. *EMBO Journal* 7: 3441-3449, 1988
- Andersson G., Lindblom B., Andersson L., Gorski J., Mach B. y Rask L.: The single DRB gene of the DRw8 haplotype is closely related to the DRBIII gene encoding DRw52. *Immunogenetics* 28: 1-5, 1988
- Ando A., Kawai J., Maeda M., Tsuji K., Trowsdale J. y Inoko H.: Mapping and nucleotide sequence of a new HLA class II light chain gene, DQB3. *Immunogenetics* 30: 243-249, 1989
- Arnaiz-Villena A., Belvedere M., Decary F., Fotino M., Helse E., Hogan V., Martinetti M., Muller C., Richiardi P., Vicario J.L., Barbanti M., Bruyere J., Caruso C., Conighi C., Gelsthorpe K., Hammond M., López-Larrea C., Mervart H., Peruccio D., Regueiro J.R. y Schreuder I.: Antigen Society #15 Report (Bw4 and Bw6) en *Immunobiology of HLA vol. I*, Dupont B., ed., pp 214-217, Springer-Verlag, New York, 1989
- Arnaiz-Villena A., Vicario J.L., Martínez-Laso J., Corell A., Regueiro J.R., Gómez-Reino J. y Gómez-Reino J.: An Eco-RI polymorphic site in the human complement C4 gene distinguishes Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA) susceptibility bearing haplotypes. *Molecular Immunology* 26: 427-430, 1989b
- Awdeh Z.L., Raum D., Yunis E.J. y Alper C.A.: Extended HLA/complement allele haplotypes: Evidence for T/t-like complex in men. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 259-263, 1983
- Awdeh Z.L. y Alper C.A.: Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3576-3580, 1980

B

- Bach F.H. y Amos D.B.: HU-1: Major histocompatibility locus in man. *Science* 156: 1506-1508, 1967
- Bell J.I., Denney D., Foster L., Belt T., Tood J.A. y McDevitt H.O.: Allelic variation in the DR subregion of the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6234-6238, 1987
- Benaceraf B.: Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212: 1229-1238, 1981
- Bertrams J. y Mauff G.: Another family with a silent allele of properdin factor B polymorphism (Bf*Q0). *Human Genetics* 70: 321-323, 1985
- Betuel H., Gebuhrer L., Schreuder G.M.T., Goldman S.F., Arnaiz-

Villena A. y Layrisse Z.: HLA-DRw6 and its subgroups HLA-DRw13 y HLA-DRw14. in *Histocompatibility Testing 1984*, pag. 190-192, Springer-Verlag, Berlin 1984

- Bidwell J. y Janokl E.: HLA-DR allogentyping using exon-specific cDNA probes and applications of rapid minigel methods. *Molecular Immunology* 23: 1111-1116, 1986
- Bidwell J., Bidwell E., Laundry G., Kaluda P. y Bradley B.: Allogentypes defined by short DQ α and DQ β cDNA probes correlate with and define splits of HLA-DQ serological specificities. *Molecular Immunology* 24: 513-522, 1987
- Bidwell J., Bidwell E., Sansom D.M., Klouda P.T. y Bradley B.A.: The origin of HLA-DR*Br: exon 2 nucleotide sequence implicates gene conversion of DR1 by DR4-Dw10, DR5 or DRw6-Dw18. *Human Immunology* 26: 191-197, 1989
- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennet W.S., Strominger J.L. y Wiley D.C.: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512, 1987
- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennet W.S., Strominger J.L. y Wiley D.C.: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518, 1987b
- Bodmer J.F. in *Histocompatibility Testing 1977*. Bodmer W.F., Batchelor J.R., Bodmer J.G., Festenstein H. y Morris P.J. eds. Munksgaard, Copenhagen, 1978
- Bodmer J.G., Marsh S.G.E., Albert E.D., Bodmer W.F., Dupont B., Erlich H.A., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Sasazuki T., Schreuder G.M.T., Strominger J.L., Svejgaard A. and Terasaki P.I.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. *Tissue Antigens* 39: , 1992
- Böhme J., Andersson M., Andersson G., Möller E., Peterson P.A. y Rask L.: HLA DRB genes vary in number between different DR specificities whereas the number of DQB genes is constant. *J. Immunology* 135: 2149-2155, 1985
- Brostoff J., Scadding G.K., Male D. y Roitt I.M.: *HLA and disease in Clinical Immunology*, Brostoff J., Scadding G.K., Male D. y Roitt I.M. eds. Glover Medical Publishing, London, 1991
- Brown J.H., Jardetzky T., Saper M.A., Samraoui B., Bjorkman P.J. y Wiley D.C.: A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332: 845-850, 1988
- Burke P.A. y Ozato K.: *Regulation of major histocompatibility complex class I genes*. in *The year in Immunology 1988*. Cruse J.M. and Lewis R.E. Jr., eds. Karger, Basel vol 4: pp 23-40, 1989
- Busetta B. y Barrans Y.: The prediction of protein topologies. *Biochimica et Biophysica Acta* 701: 111-118, 1982

C

- Carroll M.C., Campbell R.D., Bentley D.R. y Porter R.R.: A molecular map of the major histocompatibility complex class III region of man linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* 307: 237-241, 1984

Carroll M.C., Campbell R.D., Porter R.R.: The mapping of 21-hydroxylase genes adjacent to complement component genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 521- ,1985a

Carroll M.C., Palsdottir A., Belt K.T. y Porter R.R.: Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. *EMBO Journal* 4: 2547-2552, 1985b

Carroll M.C., Katzman P., Alicot E.M., Koller B.H., Geraghty D.E., Orr H.T., Strominger J.L., Spies T.: Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8535-8539, 1987

Corell A., Morales P., Varela P., Paz-Artal E., Martín-Villa J.M., Martínez-Laso J. y Arnalz-Villena A.: Allelic Diversity at the primate major histocompatibility complex DRB6 locus. *Immunogenetics* 36: 33-38, 1992

D

Davis R.W., Thomas M., Cameron J., St. John T.P. y Padgett R.A.: Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis. *Meth. Enzymol.* 65: 404-411, 1980

DeNagel D.C. y Pierce S.K.: A case for chaperones in antigen processing. *Immunology Today* 13: 86-89, 1992

Dausset J.: Leuco-agglutinins. IV: Leucoagglutinins and blood transfusion. *Vox Sanguinis* 4: 190-198, 1954

Dausset J.: Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematologica* 20: 156-166, 1958

Dupont B.: *Immunobiology of HLA*. Volúmenes I y II. Dupont B. ed. Springer-Verlag, New-York, 1989

E

Erlich H.A.: HLA and Insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 337: 415, 1989

F

Feinberg A.P. y Vogelstein B.: A technique for radiolabelling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* 137: 266-267, 1984

Ferrando P., San Román C., Rodríguez de Córdoba S. y Arnalz-Villena A.: Partial trisomy 6p:46,XX,-10,der(10), T(6;10)(p22;q26) pat and HLA localisation. *J. Med. Genet.* 18: 231-234, 1981

Flaherty L.: The Tla region antigens. in: Dorf E.D., ed. *The role of the Major Histocompatibility complex in Immunobiology*. New York. London: Garland STPM Press, pp 33-57, 1981.

Flavell R.A., Allen H., Huber B., Wake C. y Wiedera G.: Organization

and expression of the MHC of the C57black/10 mouse. *Immunol. Reviews* 84: 29-50, 1985

Freemont P.S., Hanson I.M. y Trowsdale J.: A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64: 483-484, 1991

G

Garnier J., Osguthorpe D.J. y Robson B.:..... *J. of Mol. Biol.* 120: 97-120, 1978

Geraghty D.E., Koller B.H. y Orr H.T.: A human histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9145-9149, 1987

Geraghty D.E., Wei X., Orr H.T. y Koller B.H.: Human leukocyte antigen F (HLA-F): An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *J. Exp. Med.* 171: 1-18, 1990

Glynne R., Powis S.H., Beck S., Kelly A., Kerr L.A. y Trowsdale J.: A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353: 357-360, 1991

Gocayne J., Robinson D.A., Fitzgerald M.G., Chung F.Z., Kerlavage A.R., Lentes K.V., Lal J., Wang C.D., Fraser C.M y Venter J.G.: Primary structure of rat cardiac β -adrenergic and muscarinic cholinergic receptors obtained by automated DNA sequence analysis: further evidence for a multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8296-8300, 1987

Gorski J.: The HLA DRw8 lineage was generated by a deletion in the DRB region followed by first domain diversification. *J. Immunology* 142: 4041-4045, 1989

Gregersen P.K., Shen M., Song Q.L., Merryman P., Degar S., Sekl T., Maccari J., Goldberg D., Murphy H., Schwenzer J.,.....: Molecular diversity of HLA-DR4 haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2642-2646, 1986

Gregersen P.K., Silver J. y Winchester R.J.: The shared epitope hypothesis. *Arth. and Rheum.* 30: 1205-1213, 1987

H

Haas D., Boss J.A., Strominger J.L. y Spies T.: A highly diverged β 1 exon in the DR region of the human MHC: sequence and evolutionary implications. *Immunogenetics* 25: 15-20, 1987

Hanson I.M., Gorman P., Lui V.C., Cheah K.S., Solomon E., Trowsdale J.: The human alpha 2 (XI) collagen gene (COL11A2) maps to the centromeric border of the major histocompatibility complex on chromosome 6. *Genomics* 5: 925-931, 1989

Hanson I.M., Poustka A. y Trowsdale J.: New genes in the class II region of the human major histocompatibility complex. *Genomics* 10: 417-424, 1991

- Higgins D.G. y Sharp P.M.: CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73: 237-244, 1988
- Higgins D.G. y Sharp P.M.: Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* 5: 151-153, 1989
- Hirschorn K., Bach F.H., Kolodny R.L., Firschein L.L. y Hashem N.: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science* 142: 1185-1187, 1963
- Hughes A.L. y Nei M.: Pattern of substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 335: 167-170, 1988
- Hurd C.M.: A review of some aspects of the Molecular Biology of the Human Major Histocompatibility Complex (MHC). *Biotest Bulletin* 4: 35-52, 1989

I

- Ishman D. y Young J.R.: The molecular basis for the difference in immune hemolysis activity of the Chido and Rodgers isotypes of the human complement component C4. *J. Immunology* 132: 3019-3027, 1984

J

- Jonsson A.-K., Hyldig-Nielsen J.-J., Serenius B., Larhammar D., Andersson G., Jorgensen F., Peterson P.A. y Rask L.: Class II genes of the human major histocompatibility complex. Comparisons of the DQ and DX alpha and beta genes. *J. Bio. Chem.* 262: 8767-8777, 1987
- Jordan B.R., Caillol D., Damotte M., Delovitch T., Ferrier P., Kahn-Perles B., Kourilsky F., Layet C., Le Bouteiller P., Lemonnier F.A.,.....: HLA class I genes: from structure to expression, serology and function. *Immunol. Reviews* 84: 73-92, 1985

K

- Kabsch W. y Sander C.: How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS Letters* 155: 179-182, 1983
- Kaufman J.F., Auffray C., Korman A.J., Shackelford D.A. y Strominger J.L.: The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 36: 1-13, 1984
- Kawai J., Ando A., Sato., Nakatsuji T., Tsuji K. y Inoko H.: Analysis of DR2 antigens using DR gene transfer into mouse L cells. *J. Immunology* 142: 312-317, 1989
- Kelly A.P., Monaco J.J., Cho S. and Trowsdale J.: A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 353: 571-576, 1991a

- Kelly A., Powis S.H., Glynne R., Radley E., Beck S. y Trowsdale J.: Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353: 667-668, 1991b

- Kelly A. y Trowsdale J.: Complete nucleotide sequence of a functional HLA-DPB gene and the region between the DPB1 and DPA1 genes: comparison of the 5' ends of HLA class II genes. *Nucleic. Acid. Res.* 13: 1607-1621, 1985

- Klein J.: Evolution and function of the major histocompatibility system; Facts and speculations. en: *The major Histocompatibility system in man and animals*. Götze D. ed. Springer-Verlag, New York, pp 339-378, 1977

- Klein J.: The major histocompatibility complex. En: *Immunology: the science of self-nonself discrimination*. Klein J. ed. John Wiley and sons, New York. pp 270-309, 1984

- Klein J.: Origin of Major Histocompatibility Complex Polymorphism: the trans-species hypothesis. *Human Immunology* 19: 155-162, 1987

- Klein J.: The major histocompatibility complex. En: *Immunology*. Klein J. ed. Blackwell Scientific Publications, Massachusetts. pp 161-187, 1990

- Klein J., Kasahara M., Guttmacht J. y Figueroa F.: Origin and function of MHC polymorphism. *Chemical Immunology* 49: 35-50, 1990

- Klein J., Kasahara M., Guttmacht J. y Schönbach C.: Phylogeny of Primate Major Histocompatibility Complex DRB alleles. *Human Immunology* 31: 28-33, 1991

- Koller B.H., Geraghty D.E., DeMars R., Duvick L., Rich S.S. y Orr H.T.: Organization of the human class I histocompatibility complex genes. *Immunol. Reviews* 6: 1-10, 1987

- Koller B.H., Geraghty D.E., Shimizu Y., DeMars R. y Orr H.T.: HLA-E: a novel class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J. Immunology* 141: 897-904, 1988

- Korman A.J., Boss J.M., Spies T., Sorrentino P., Okada K. y Strominger J.L.: Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens. *Immunol. Reviews* 85: 45-86, 1985

- Kostyu D.D., Cresswell P. y Amos D.B.: A public HLA antigen associated with HLA-A9, Aw32 and Bw4. *Immunogenetics* 10: 433-442, 1980

- Kvist S., Wlman K., Claesson L., Peterson P.A. y Dobberstein B.: Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* 29: 61-69, 1982

L

- Law J.K.A., Dodds A.W. y Porter R.R.: A comparison of the properties of two classes, C4A and C4B, of the human complement component C4. *EMBO Journal* 3: 1819-1823, 1984

- Lawlor D.A., Zemmour J., Ennis P.D. y Parham P.: Evolution of class I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 23-63, 1990

- Lawrance S.K., Das H.K., Pan J. y Weissmann S.M.: The genomic organization and nucleotide sequence of the HLA-SB (DP) alpha gene. *Nucleic Acid Res.* 13: 7515-7528, 1985
- Lawrance S.K., Smith C.L., Srivastava R., Cantor C.R. y Weissman S.M.: Megabase-scale mapping of the HLA gene complex by pulsed field gel electrophoresis. *Science* 235: 1387-1390, 1987
- Layet C., Delovitch T., Ferrier P., Caillol D.H., Jordan B.R. y Lemonnier F.A.: Expression of an HLA-Bw6-related specificity by the HLA-Cw6 molecule. *Immunogenetics* 21: 469-478, 1985
- Levi-Strauss M., Carroll M.C., Steinmetz M. y Meo T.: A previously undetected MHC gene with an unusual periodic structure. *Science* 240: 242-251, 1988

M

- Malissen M., Malissen B. y Jordan B.R.: Exon-Intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 893-897, 1982
- Marsh S.G.E. y Bodmer J.G.: HLA class II nucleotide sequences, 1991. *Human Immunology* 31: 207-227, 1991
- Marshall W.H., Neugebauer M., Baur M.P. y Albert E.D.: The second complement component C2 in the Ninth Workshop. En *Histocompatibility Testing 1984*. Albert E.D., Baur M.P., Mayr W.R., eds., Springer-Verlag, Berlin. pp 313-316, 1984
- Martínez-Laso J., Vicario J.L., Corell A., Morales P., Regueiro J.R. y Aranz-Villena A.: A new HLA-DQA1 RFLP allele (DQ α 3b) distinguishes between DQ α genes of DQ α 2-DR3 and DQ α 3-DR5 haplotypes. *Nucleic Acid Res.* 17: 4911, 1989
- Mauff G., Alper C.A., Awdeh Z., Batchelor J.R., Bertrams J., Bruun-Petersen G., Dawkins R.L., Demant P., Edwards J., Grosse-Wilde H., Hauptmann G., Kluda P., Lamm L., Mollenhauer E., Nerl C., Olaisen B., O'Neill G., Rittner C., Roos M.H., Skanes V., Teisberg P. y Wells L.: Statement on the nomenclature of human C4 allotypes. *Immunobiology* 164: 184-191, 1983
- Mauff G.: Application of the MHC-class III complement markers to population genetics. En: *Human Population Genetics*. Colloque INSERM 142. Ohayon E. y Cambón-Thomson A., eds., INSERM, Paris, pp 143-166, 1986
- Mauff G., Brenden M., Braun-Stilwell M., Doxiadis G., Giles C.M., Hauptmann G., Rittner C., Schneider P.M., Stradmann-Bellinghausen B. y Uring-Lambert B.: C4 reference typing report. *Complement. Inflamm.* 7: 193-212, 1990
- Meo T., Atkinson J.P., Bernoco M., Bernoco D. y Cepellini R.: Structural heterogeneity of C2 complement protein and its genetics variants in man: a new polymorphism of the HLA region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1672-1675, 1977
- Meunier H.F., Carson S., Bodmer W.F. y Trowsdale J.: An isolated β 1 exon next to the DR α gene in the HLA-D region. *Immunogenetics* 23: 172-180, 1986
- Mittal K.K., Mickey M.R., Singal D.P. y Terasaki P.I.: Serotyping for homotransplantation XVIII. Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Transplantation* 6: 913-927,

1968

- Mizuno S., Trapani J.A., Koller B.H., Dupont B. y Yang S.Y.: Isolation and nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a novel HLA class I gene. *J. Immunology* 140: 4024-4030, 1988
- Möller E., Carlsson B. y Wallin J.: Implication of structural class II gene polymorphism for the concept of serologic specificities. *Immunol. Reviews* 85: 107-128, 1985
- Monaco J.J.: A molecular model of MHC class I-restricted antigen processing. *Immunology Today* 13: 173-179, 1992
- Morales P., Martínez-Laso J., Martín-Villa J.M., Corell A., Vicario J.L., Varela P., Pérez-Aclego P. y Aranz-Villena A.: High frequency of the HLA-DRB1*0405-(Dw15)-DQw8 haplotype in Spaniards and its relationship to Diabetes susceptibility. *Human Immunology* 32: 170-175, 1991
- Morel Y., Bristow J., Gitelman S.E. y Miller W.L.: Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement component C4 gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6582-6586, 1989
- Mortensen J.P., Buskjaer L. y Lamm L.V.: Studies of the C2-deficiency gene in man. *Immunology* 39: 541-549, 1980

N

- Nagy Z., Baxevanis C., Ishii N. y Klein J.: Ia antigens as restriction molecules in Ir-gene controlled T-cell proliferation. *Immunol. Reviews* 60: 61-83, 1981

O

- Okada K., Boss J.M., Prentice H., Spies T., Mengler R., Auffray C., Lillie J., Grossberger D. y Strominger J.L.: Gene organization of DC and DX subregions of the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3410-3414, 1985
- Olaisen B., Teisberg P., Jonhassen R., Thorsby E. y Gedde-Dahl T.: Gene order and gene distances in the HLA region studied by the haplotype method. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 285-292, 1983
- O'Neill G.J., Yang S.Y. y Dupont B.: Two HLA-linked loci controlling the fourth component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5165-5169, 1978
- Orr H.T. y DeMars R.: Class I-like HLA genes map telomeric to the HLA-A2 locus in human cells. *Nature* 302: 534-536, 1983

P

- Paul P., Fauchet R. y Boscher M.Y.: Isolation of a human major histocompatibility complex class I gene encoding a nonubiquitous molecule expressed on activated lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2872-2876, 1987
- Parham P., Lawlor D.A., Lomen C.E., y Ennis P.D.: Diversity and diversification of HLA-A, B, C alleles. *J. Immunology* 142: 3937-3950, 1989
- Payne R. y Rolfs M.R.: Fetomaternal leucocyte incompatibility. *J. Clin. Invest.* 37: 1756-1763, 1958
- Porter R.R.: The complement components coded in the major histocompatibility complexes and their biological activities. *Immunol. Reviews* 87: 7-17, 1985
- Powis S.H., Mockridge I., Kelly A.,.....: Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human MHC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; , 1992

R

- Ragousis J., Bloemer K., Pohla H., Messer G., Weiss E.H., Ziegler A.: A physical map including a new class I gene (cda12) of the human major histocompatibility complex (A2/B13 haplotype) derived from a monosomy 6 mutant cell line. *Genomics* 4: 301-308, 1989
- Raum D., Awdeh Z.L., Andersson J., Strong L., Granados J., Teran L., Gillelt E., Yunis E.J. y Alper C.A.: Human C4 haplotypes with duplicated C4A or C4B. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 72-79, 1984
- Rollini P., Mach B. y Gorski J.: Linkage map of three HLA-DR β chain genes. Evidence for a recent duplication event. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7197-7201, 1985
- Rynes R.I.: Inherited complement deficiency states and SLE. *Clin. Rheum. Dis.* 8: 29-47, 1982

S

- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. y Arnheim N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354, 1985
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 5463-5467, 1977
- Sargent C.A., Dunham I. y Campbell R.D.: Identification of multiple

HTF-island associated genes in the human major histocompatibility complex class III region. *EMBO Journal* 8: 2305-2312, 1989

- Sargent C.A., Dunham I., Trowsdale J. y Campbell R.D.: Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1968-1972, 1989b
- Schackelford D.A. y Strominger J.L.: Analysis of the oligosaccharides on the HLA-DR and DC B cell antigens. *J. Immunology* 130: 274-282, 1983
- Scharf S.J., Long C.M. y Erlich H.A.: Sequence analysis of the HLA-DR β and HLA-DQB loci from three pemphigus vulgaris patients. *Human Immunology* 22: 61-69, 1988
- Schreuder G.M.T., Kennedy L.J., Gebuhrer L., Awad J., Betuel H., Degos L. y Jeannet M.: HLA-DR5 and its subtypes HLA-DRw11 and DRw12. en: *Histocompatibility Testing 1984*. pp 192-197, Springer-Verlag, Berlin, 1984
- Schwartz R.: T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 237-261, 1985
- Servenius B., Gustafsson K., Widmark E., Emmoth E., Andersson G., Larhammar D., Rask L. y Peterson P.A.: Molecular map of the human HLA-SI3 (HLA-DP) region and sequence of an SI3 α (DPA) pseudogene. *EMBO Journal* 3: 3209-3214, 1984
- Shaw S., Johnson A.H. y Shearer G.M.: Evidence for a new segregant series of B-cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogeneic proliferative and cytotoxic responses. *J. Exp. Med.* 152: 565-579, 1980
- Shulman N.R., Aster R.M., Pearson H.A. y Miller M.C.: Immunoreactions involving platelets. VI. Reactions of maternal isoantibodies responsible for neonatal purpura. Differentiation of a second platelet antigen system. *J. Clin. Invest.* 41: 1059-1069, 1962
- Southern E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molec. Biol.* 98: 503-517, 1975
- Spence M.A., Spurr N.K. y Field L.L.: Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. *Cytogenet. Cell. Genet.* 51: 149-165, 1989
- Spies T., Blanck G., Bresnahan M., Sands J. y Strominger J.: A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 243: 214-217, 1989
- Spies T., Bresnahan M., Bahram S., Arnold D., Blanck G., Mellins E., Pious D. y DeMars R.: A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 348: 744-747, 1990
- Spies T., y DeMars R.: Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* 351: 323-324, 1991
- Spies T., Morton C.C., Nedospasov S.A., Fiers W., Pious D., Strominger J.L.: Genes for the tumor necrosis factors α and β are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8699-8702, 1986

Spies T., Sorrentino R., Boss J.M., Okada K. y Strominger J.L.: Structural organization of the DR subregion of the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5165-5169, 1985

Srivastava R., Chonery M.J. y Lawrence S.K.: Structure, expression, and molecular mapping of a divergent member of the class I HLA gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4224-4228, 1987

Srivastava R., Ducean B.W., Biro P.A., Sood A.S. y Weissman S.M.: Molecular organization of the class I gene of human major histocompatibility complex. *Immunol. Reviews* 84: 93-121, 1985

Strachan T.: Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. *British Medical Bulletin* 43: 1-14, 1987

T

Takahashi M., Takahashi S. y Hirose S.: Solubilization of antigen-antibody complexes: a new function of complement as a regulator of immune reactions. *Prog. Allergy* 27: 134-138, 1980

Tanigaki N. y Tosi R.: The genetic control of human Ia alloantigens: a three-loci model derived from the immunochemical analysis of "supertypic" specificities. *Immunol. Reviews* 66: 5-37, 1982

Terasaki P.I. y McClelland J.D.: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204: 998-1000, 1964

Tonnelle C., DeMars R. y Long E.O.: DOB: A new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO Journal* 4: 2839-2847, 1985

Trowsdale J.: Genetics and polymorphism: class II antigens. *British Medical Bulletin* 43: 15-36, 1987

Trowsdale J., Groves V. y Amason A.: Limited MHC polymorphism in whales. *Immunogenetics* 29: 19-24, 1989

Trowsdale J., Hanson I., Mockridge I., Beck S., Townsend A. y Kelly A.: Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348: 741-744, 1990

Trowsdale J. y Kelly A.: The human class II α chain gene DZ α is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO Journal* 4: 2231-2237, 1985

Trowsdale J., Ragousis J. y Campbell R.D.: Map of the human MHC. *Immunology Today* 12: 443-446, 1991

V

Van Leeuwen A., Schmit H.R.E. y van Rood J.J.: Typing for MLC (LD) II. The selection of nonstimulator cells by MLC inhibition test using SD-identical stimulator cells (mls) and fluorescence antibody studies. *Transplant. Proc.* 5: 1539-1542, 1973

Van Rood J.J., van Leeuwen A. y Eernisse J.G.: Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 181: 1735-1736, 1958

Van Rood J.J. y Van Leeuwen A.: Leucocyte grouping: a method and its application. *J. Clin. Invest.* 42: 1382-1390, 1963

W

Weiss E.H., Mellor A., Golgen L., Fahrner K., Simpson E., Hurst J. y Flavell R.: The structure of a mutant H2 gene suggests that the generation of polymorphism in H-2 genes may occur by gene conversion-like events. *Nature* 301: 671-674, 1983

White P.C.: Molecular genetics of the class III region of the HLA complex. En: *Immunobiology of HLA vol. II*. Dupont B., ed. Springer-Verlag, New York. pp 62-69, 1989

Wilbur W.J. y Lipman D.J.: Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 726-730, 1983

Winchester R.J. y Kunkel H.G.: The human Ia system. *Adv. Immunol.* 28: 221-242, 1979

Wood W.I., Glitschier J., Lasky L.A. y Lawn R.M.: Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1585-1588, 1985

Wu S., Saunders T.L. y Bach F.: Polymorphism of human Ia antigens generated by reciprocal intergenic exchange between two DR β loci. *Nature* 324: 676-679, 1986

Y

Yang S.Y., Milford E., Hämmerling U. y Dupont B.: Description of the reference panel of B-lymphoblastoid cell lines for factors of the HLA-system: the B-cell line panel designed for the Tenth International Histocompatibility Workshop. In: Dupont B., ed., *Immunobiology of HLA vol I*, pp 11-19, Springer-Verlag, New York, 1989

Yu C.Y.: The complete exon-intron structure of a human complement component C4A gene. *J. Immunology* 146: 1057-1066, 1991

Yu C.Y. y Campbell R.D.: Definitive RFLPs to distinguish between the human complement C4A/C4B isotypes and the major Rodgers/Chido determinants: application to the study of C4 null alleles. *Immunogenetics* 25: 383-390, 1987



Anexo I

ABREVIATURAS MAS COMUNES UTILIZADAS EN EL TEXTO

β2-m:	β2-microglobulina
BAT:	Tránscrios asociados al locus B
bp:	par de bases de DNA
cDNA:	DNA complementario (sintetizado a partir de RNA "in vitro")
cM:	centi-Morgan: unidad de longitud de DNA calculada por estudios de recombinación
CRE:	Elemento regulador de clase I
DAF:	Factor de disminución de la aceleración
gp:	Glicoproteína
GLO:	Glioxalasa
HLA:	Antígenos Leucocitarios Humanos
HSP:	Proteínas de shock térmico
IRS:	Secuencia de respuesta a interferón
kb:	kilo-base (1000 pares de bases)
kd:	kilo-dalton
LMP:	Proteasa grande y multifuncional
MHC:	Sistema Principal de Histocompatibilidad
OSG:	Gen codificado en la hebra opuesta
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE:	Electroforesis en campo pulsante
RFLP:	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
TAP:	Transportadores asociados con el proceso de antígenos
TCR:	Receptor para antígeno del linfocito T
TNF:	Factor de Necrosis Tumoral
UT:	Región no-traducida
21-OH:	21-hidroxilasa